



**Co-expression et caractérisation fonctionnelle d'un
transporteur de lipides (une “ flippase ”) de la levure *S.
cerevisiae*: l'ATPase P4 Drs2p, en complexe avec sa
sous-unité associée Cdc50p**

Aurore Jacquot

► **To cite this version:**

Aurore Jacquot. Co-expression et caractérisation fonctionnelle d'un transporteur de lipides (une “ flippase ”) de la levure *S. cerevisiae*: l'ATPase P4 Drs2p, en complexe avec sa sous-unité associée Cdc50p. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT: 2012PA11T081. tel-00938337

HAL Id: tel-00938337

<https://theses.hal.science/tel-00938337>

Submitted on 24 Nov 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE PARIS SUD

FACULTE DE MEDECINE PARIS SUD

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS SUD

Ecole Doctorale 419 « Signalisations et réseaux intégratifs en Biologie, Bio-SigNE»

Présentée et soutenue publiquement par

Aurore JACQUOT

Le 30 novembre 2012

**Co-expression et caractérisation fonctionnelle
d'un transporteur de lipides (« Flippase »)
de la levure *S. cerevisiae* :
l'ATPase P4 Drs2p, en complexe avec
sa sous-unité associée Cdc50p.**

Directeur de thèse: M. Marc le MAIRE
Co-directeur de thèse : M. Guillaume LENOIR

JURY

Mr Oliver NÜSSE (Président du Jury)
Mme Isabelle MUS-VETEAU (Rapporteuse)
Mr Patrice CATTY (Rapporteur)
Mme Sophie CRIBIER (Examinatrice)
Mme Karine MONCOQ (Examinatrice)
Mr Marc le MAIRE (Examineur, directeur de thèse)

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Marc le Maire et Guillaume Lencir d'avoir accepté d'être mes directeurs de thèse. Je les remercie pour leur accueil, leur patience (en particulier pour Guillaume), leur disponibilité, leur soutien et pour m'avoir accordé leur confiance.

Je tiens particulièrement à remercier Guillaume pour son encadrement, ses conseils et la patience dont il a fait preuve afin de me transmettre ses méthodes de travail.

Je remercie également Philippe Champeil pour toutes les discussions passionnantes et enrichissantes que nous avons eues. Je remercie Philippe et Cédric Montigny pour leur énorme contribution à ce travail et leur disponibilité.

Je remercie Hassina Azouacui et Raphaëlle Barry avec qui j'ai eu la chance de travailler pour nos discussions, les manips réalisées ensemble et l'amitié qui a découlé de ces moments passés ensemble.

Je remercie spécialement Christine Jaxel pour son soutien, ses conseils et sa grande disponibilité.

Je remercie Manuel Garrigos, Béatrice de Foresta, Veronica Beswick, Alain Sanson, Pierre Nédellec, Nadège Jamin, Francis Haraux et Claire Lemaire pour leur conseil et leur disponibilité.

Je remercie aussi les « jeunes » que j'ai rencontrés durant ces trois années : Cindy, Paul, Stéphanie, Sana, Qian, Margaux, Lila, Gaëlle, Céline, Tiona, Mehdi et. Je les remercie pour leur soutien, leur bonne humeur et leur disponibilité. J'en profite pour remercier également Pascale, Josiane et tout le personnel administratif pour leur disponibilité afin de résoudre tous les petits problèmes que j'ai pu rencontrer.

Je tiens aussi à remercier Lisette Cohen, ma tutrice de monitorat, pour ses conseils, sa patience, sa disponibilité et la confiance qu'elle m'a accordée concernant l'enseignement. J'en profite pour remercier toute l'équipe pédagogique de l'Université Paris Sud avec qui j'ai eu le plaisir de travailler ainsi que les préparatrices de TP et Martine Bouillault qui m'ont gentiment intégrée à leur table.

Je remercie Pontus Gourdon, Poul Nissen, Frank Fijalkowski, Miriam-Rose Ash et plus particulièrement, Hanka Hennrich et Joost Holthuis pour leur collaboration au cours de ces trois années.

Je remercie les membres du Jury : Isabelle Mus-Veteau, Patrice Catty, Sophie Cribier, Karine Moncoq et Oliver Nisse d'avoir accepté d'évaluer ce travail. Je remercie Thierry Touze d'avoir accepté d'être mon tuteur de thèse.

Je tiens à remercier spécialement mes parents, ma sœur, mon frère, mes grands-parents (même si malheureusement tous ne seront pas là pour voir l'aboutissement de toutes ces années d'études), mes oncles, tantes, cousin(e)s, Jean-Pierre, ma belle-famille ainsi que mes amies Lucie, Mélanie, Paola, Farah, Anaïs et Julie pour leur énorme soutien depuis plusieurs années.

Enfin, je tiens à remercier du plus profond de mon cœur mon ami, Eghardine, qui me soutient depuis de nombreuses années et sans qui tout cela n'aurait pas été possible.

Sommaire

<u>Abréviations</u>	9
I. Introduction	11
I.1 Introduction générale.....	11
a) <i>Rôle de l'asymétrie des lipides</i>	12
b) <i>Création et maintien de l'asymétrie des lipides membranaires</i>	13
I.2 Les ATPases de type P	15
a) <i>Les ATPases de type P et leurs différentes sous-familles</i>	15
b) <i>Les caractéristiques structurales des ATPases de type P</i>	18
c) <i>Les caractéristiques fonctionnelles des ATPases de type P</i>	21
d) <i>La régulation des ATPases de type P</i>	22
I.3 Les ATPases P4 et la famille des protéines CDC50	23
a) <i>Généralités sur les ATPases P4 et les protéines CDC50</i>	23
b) <i>Fonction des ATPases P4</i>	28
• <i>Les ATPases P4 semblent être des transporteurs de lipides</i>	28
• <i>Les ATPases P4 sont impliquées dans le trafic vésiculaire</i>	29
• <i>Les ATPases P4 sont également impliquées dans de nombreuses pathologies</i>	31
c) <i>Régulation des ATPases P4</i>	33
I.4 Problématique et objectifs de la thèse	34
II. Matériel et méthodes	37
I.1 Matériel	37
I.2 Stratégie de clonage	37
a) <i>Description du vecteur</i>	37
b) <i>Construction des vecteurs de simple expression portant les gènes DRS2, DRS2^{D560N} ou CDC50 (réalisée avant mon arrivée au laboratoire)</i>	38
c) <i>Construction des vecteurs de co-expression, portant les gènes DRS2 ou DRS2^{D560N} avec le gène CDC50</i>	39
• <i>Avec un site de coupure par la thrombine (réalisée avant mon arrivée au laboratoire)</i>	39

• Avec un site de coupure par la TEV.....	40
d) Construction des délétions N- et C-terminales de DRS2	42
I.3 Méthodes de biologie moléculaire.....	43
a) PCR	43
• PCR classique	43
• PCR de fusion	44
b) Nettoyage des produits de PCR et de digestion	45
c) Séparation, quantification et purification de l'ADN sur gel d'agarose	45
d) Digestion de l'ADN par des enzymes de restriction	45
e) Déphosphorylation de l'ADN	45
f) Ligation de l'ADN.....	45
g) Préparation des bactéries <i>E. coli</i> compétentes (JM109)	45
h) Transformation des bactéries compétentes.....	46
i) Préparation de l'ADN génomique de levure	46
j) Test de croissance des levures à basse température.....	46
k) Délétion des gènes DRS2 et CDC50 endogènes	47
I.4 Expression de Drs2p et Cdc50p	47
a) Description de la souche de levure	47
b) Transformation des levures.....	48
c) Préparation de fractions membranaires totales après croissance des levures en milieu minimum .	49
d) Préparation des fractions membranaires C3 et C2 après croissance des levures en milieu riche	49
e) Dosage des protéines totales par la méthode BCA	50
f) Analyse par SDS-PAGE.....	51
g) Déglycosylation de Cdc50p.....	53
• Tests initiaux en conditions dénaturantes	53
• Déglycosylation de Cdc50p en conditions non dénaturantes, et effet sur la mesure du dérivé phosphorylé	53
I.5 Caractérisation fonctionnelle du complexe Drs2p/Cdc50p	53
a) Mesure de la formation de dérivé phosphorylé par le [γ - ³² P] ATP (filtration).....	53
• Phosphorylation	53
• Déphosphorylation	54
b) Mesure du dérivé phosphorylé par autoradiographie d'un gel de type Sarkadi	54
c) Activité ATPasique	55
I.6 Purification du complexe Drs2p/Cdc50p.....	55
a) Test de solubilisation en présence de différents détergent.....	55
b) Purification par chromatographie d'affinité sur résine Ni ²⁺ -NTA.....	55
c) Purification par chromatographie d'affinité sur résine Streptavidine	56
d) Filtration sur gel en HPLC	58

III.1 Expression dans la levure du complexe Drs2p/Cdc50p et premiers essais de caractérisation fonctionnelle..... 59

III.1.1 Introduction..... 59

III.1.2 Expression du complexe Drs2p/Cdc50p dans la levure *S. cerevisiae* 60

a) Sélection en milieu minimum de constructions portant les gènes DRS2 et CDC50 et possédant une étiquette clivable par la thrombine, et création du vecteur de co-expression 60

b) Croissance en milieu riche et co-expression des protéines Drs2p-Bad et Cdc50p-His₁₀ 64

• *Mise au point* 64

• *Analyse de l'expression de Drs2p-Bad et de Cdc50p-His₁₀ en milieu riche* 68

c) Discussion 72

III.1.3 Caractérisation fonctionnelle du complexe Drs2p/Cdc50p exprimé dans la levure *S. cerevisiae* 73

a) Phosphorylation de Drs2p dans les fractions membranaires C2 et C3..... 73

b) La co-expression de Cdc50p avec Drs2p est cruciale pour la phosphorylation de Drs2p 74

c) La glycosylation de Cdc50p n'est pas requise pour la phosphorylation de Drs2p 76

d) Optimisation des conditions de phosphorylation de Drs2p..... 77

e) Inhibiteurs de la phosphorylation de Drs2p : vanadate et fluorures 82

f) Solubilisation du complexe Drs2p/Cdc50p par les détergents et conséquences fonctionnelles 85

• *Solubilisation des protéines Drs2p et Cdc50* 85

• *Conséquences fonctionnelles immédiates de la solubilisation du complexe Drs2p/Cdc50p, et inactivation ultérieure en fonction du temps* 87

g) Cinétique de déphosphorylation de Drs2p 89

h) Discussion 93

III.2 Purification du complexe Drs2p/Cdc50p..... 99

III.2.1 Introduction..... 99

III.2.2 Essais initiaux de purification par chromatographie d'affinité en tandem..... 99

III.2.3 Purification du complexe Drs2p/Cdc50p en une seule étape, par chromatographie d'affinité sur résine streptavidine..... 103

a) Obtention de constructions possédant une étiquette clivable par la protéase TEV..... 103

b) Mise au point de la purification du complexe Drs2p/Cdc50p en une étape..... 104

c) Protocole final de purification du complexe Drs2p/Cdc50p en une seule étape 107

d) Purification du complexe Drs2p^{D560N}-Bad/Cdc50p-His₁₀ par chromatographie d'affinité sur résine streptavidine..... 110

e) Analyse par filtration sur gel en HPLC des éluats issus de la purification sur résine streptavidine. 112

<i>f) Échange du DDM par le C₁₂E₈ sur colonne streptavidine et purification d'un complexe inhibé par le fluorure de béryllium</i>	114
<i>g) Mesures d'activité ATPasique après purification</i>	116
<i>h) Discussion</i>	118

III.3 Caractérisation préliminaire du rôle des extrémités N- et C-terminale de Drs2p 121

III.3.1 Introduction : phosphorylation et déphosphorylation d'une version tronquée de Drs2p	121
---	-----

III.3.2 Clonage des différentes versions tronquées de Drs2p dans le vecteur pYeDP60	125
---	-----

III.3.3 Analyse de la fonctionnalité des protéines tronquées et de leur expression en milieu minimum	128
--	-----

III.3.4. Co-expression en milieu riche des protéines tronquées et de Cdc50p-His ₁₀	130
---	-----

III.3.5 Discussion	134
--------------------------	-----

IV. Conclusions et perspectives 137

V. Bibliographie..... 143

<u>Annexe 1</u>	155
------------------------------	-----

<u>Annexe 2</u>	159
------------------------------	-----

<u>Annexe 3</u>	167
------------------------------	-----

<u>Annexe 4</u>	169
------------------------------	-----

Abréviations

ADP: adénosine diphosphate
ADN: acide désoxyribonucléique
APL: aminophospholipides
APLT: aminophospholipide translocase
ATP: adénosine triphosphate
ARN: acide ribonucléique
BAD: domaine accepteur de biotine
BAR: Bin–Amphiphysin–Rvs
BCA: bicinchoninic acid
BCCP: biotin carboxyl carrier protein
BET: bromure d'éthidium
BSA: bovine serum albumin
CCCP: carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone
Cer: céramide
CHAPS: 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
CMC: concentration micellaire critique
CPV: compartiment pré-vacuolaire
CYMAL-5 : 5-Cyclohexyl-1-Pentyl- β -D-Maltoside
DAG: diacylglycérol
DDAO: N,N-Dimethyldecylamine oxide
DDM: dodécyl maltoside
DMPS: 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoserine
dNTPs: désoxynucléotides triphosphates
DO: densité optique
DTT: dithiothréitol
ECL: Electrochemiluminescence
EDTA: acide éthylènediamine tétraacétique
EGTA: acide éthylènebis-(oxyéthylènenitrilo) tétraacétique
ENTH: Epsin N-terminal homology
EP: endosomes précoces
ET: endosomes tardifs
EV: empty vector
FIC1: familial intrahepatic cholestasis type 1 protein
GAP: GTPase-activating protein
GDP: guanosine diphosphate
GEF: GTP exchange factor
GFP: green fluorescent protein
GGA: Golgi-localized, gamma adaptin ear-containing
GTP: guanosine triphosphate
HEPES: acide N-2-hydroxy ethyl piperazine-N'-2-éthanesulfonique
HPLC: high performance liquid chromatography
HRP: horseradish peroxidase

IMAC: immobilized metal affinity chromatography
 LPC: lysophosphatidylcholine
 MBD: metal binding domain
 MOPS: acide 3-[N-morpholino]propanesulfonique
 MP: membrane plasmique
 NBD: 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl
 NP-40: nonyl phenoxypolyethoxyethanol
 NTA: nitrilotriacetic acid
 PA: acide phosphatidique
 PBS: phosphate buffer saline
 PC: phosphatidylcholine
 PCR: polymerase chain reaction
 PE: phosphatidyléthanolamine
 PEG: polyéthylèneglycol
 PEP: phosphoénolpyruvate
 PGK: phosphoglycérate kinase
 PH: pleckstrin homology
 PI: phosphoinositol
 PI(4)P: phosphoinositol-4-phosphate
 PK: pyruvate kinase
 PL: phospholipide
 PLN: phospholamban
 PMSF: phénylméthylsulfonylfluoride
 PNGase F: peptide N-glycosidase F
 POPC: 1-palmitoyl,2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
 POPS: 1-palmitoyl,2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoserine
 PS: phosphatidylsérine
 RE: réticulum endoplasmique
 RS: réticulum sarcoplasmique
 SDS: sodium dodécylsulfate
 SDS-PAGE: polyacrylamide gel electrophoresis
 SERCA: Sarco/Endoplasmic reticulum calcium ATPase
 SLN: sarcolipine
 SM: sphingomyéline
 TCA: trichloroacetic acid
 TES: acide 2-[[2-hydroxy-1,1-bis(hydroxyméthyl)éthyl]amino]éthanesulfonique
 TEV: Tobacco Etch Virus
 TGN: trans-Golgi network
 THR: thrombine
 Tm: température de fusion
 Tris: tris(hydroxyméthyl)aminoéthane
 UV: ultraviolet
 VS: vésicules de sécrétion post-Golgi

I. Introduction

I.1 Introduction générale

Les cellules sont des unités de base du vivant qui régulent leur propre homéostasie, mais qui doivent être aussi capables de recevoir des signaux externes afin de répondre à un besoin. Elles sont caractérisées par la présence d'une membrane plasmique, d'un cytoplasme et, dans le cas de cellules eucaryotes, d'un noyau et d'organites intracellulaires délimités par une membrane. La fonction première des membranes est la compartimentation, permettant de séparer le milieu extracellulaire du milieu intracellulaire et d'y maintenir des compositions différentes. Les premiers composants d'une membrane sont les lipides. Les lipides sont des molécules amphiphiles, c'est-à-dire qu'ils possèdent une partie polaire et une partie apolaire. En 1925, Gorter et Grendel ont présenté un modèle dans lequel la membrane plasmique des érythrocytes d'animaux était composée d'une bicouche de lipides, avec la partie apolaire au centre de la bicouche et la partie polaire de part et d'autre de la bicouche, en contact avec le milieu aqueux (Gorter and Grendel, 1925). Cette bicouche de lipides est relativement imperméable au passage de la plupart des molécules hydrosolubles et constitue la structure de base d'une membrane. Cependant, les échanges de matière et d'informations avec le milieu extérieur nécessitent la présence supplémentaire de protéines, qui sont les seconds composants des membranes. Les protéines membranaires jouent les rôles de récepteurs, de transporteurs (ou de canaux), ou de transformateurs d'énergie.

En 1972, Singer et Nicolson ont proposé le modèle de la mosaïque fluide dans lequel les protéines membranaires sont soit intrinsèques (transmembranaires) soit extrinsèques (ou périphériques) (Singer and Nicolson, 1972). Dans ce modèle, les protéines membranaires et les lipides ne sont pas reliés entre eux par des liaisons covalentes mais par des interactions dynamiques, hydrophobes ou polaires, qui permettent divers mouvements à ces deux constituants et peuvent engendrer la formation de domaines spécifiques de la membrane que l'on appelle des microdomaines. Les microdomaines membranaires sont des régions riches en cholestérol, sphingolipides et phosphatidylcholine. Ils forment des sortes de plate-formes réactionnelles, impliquées dans divers processus tels que la transduction du signal ou l'endocytose. Il a été démontré que cette diversité de fonction observée dans les microdomaines est due à une diversité de composition en termes de protéines et de lipides (Sangiorgio et al., 2004; Tan et al., 2008).

Également en 1972, Bretscher a suggéré que la répartition des lipides de la membrane plasmique des érythrocytes était asymétrique, avec le feuillet cytoplasmique enrichi en phosphatidylsérine (PS) et en phosphatidyléthanolamine (PE), et le feuillet externe enrichi en phosphatidylcholine (PC) et en sphingomyéline (SM) (Bretscher, 1972). Ces résultats ont par la suite été confirmés par d'autres équipes (Gordesky and Marinetti, 1973; Verkleij et al., 1973; Whiteley and Berg, 1974) et, sachant que certains lipides possèdent aussi des propriétés fonctionnelles importantes (en jouant le rôle de récepteurs ou de seconds messagers), ces résultats ont conduit à la formulation de deux questions :

- ⇒ Quel est le rôle de cette asymétrie ?
- ⇒ Comment cette asymétrie est-elle créée et maintenue dans les cellules ?

a) Rôle de l'asymétrie des lipides membranaires

L'asymétrie des lipides au sein des membranes procure des propriétés physico-chimiques particulières à chaque feuillet de cette membrane.

Par exemple, le feuillet externe de la membrane plasmique est enrichi en stérols et sphingolipides. Les répercussions de cet enrichissement sont importantes, puisque les sphingolipides (SL), du fait de leurs chaînes d'acide gras saturées et longues, interagissent plus fortement entre eux que les glycérophospholipides (augmentation des forces de van der Waals). Les sphingolipides possèdent aussi la capacité de former de nombreuses liaisons hydrogènes inter et intramoléculaires. Les stérols, quant à eux, sont rigides et d'architecture plane. Ces différentes propriétés permettent une interaction forte entre les SL et les stérols, ce qui rend le feuillet externe de la membrane compact et donc imperméable et rigide (Holthuis et al., 2001).

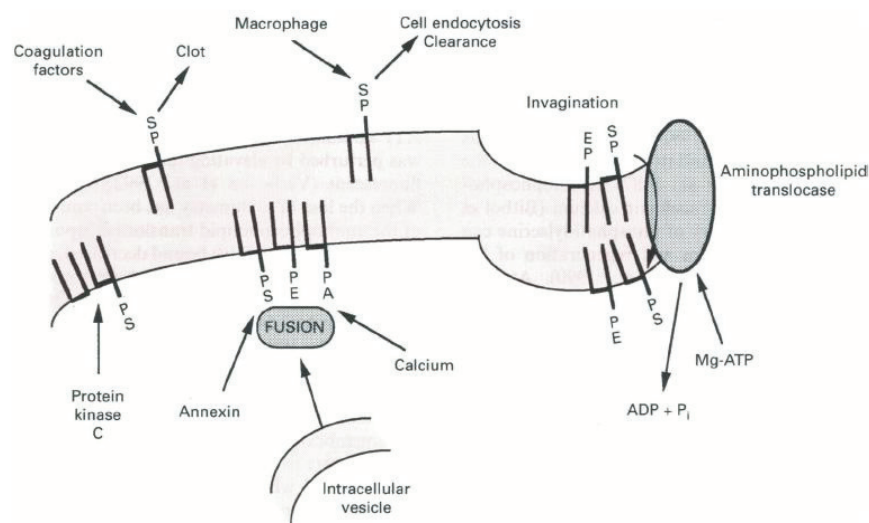


Figure 1. Réactions dépendantes des aminophospholipides (APL) au niveau des membranes plasmiques (Zachowski, 1993).

PS : phosphatidylsérine. PE : phosphatidyléthanolamine. PA : acide phosphatidique (qui n'est pas un aminophospholipide).

D'un autre côté, l'enrichissement en aminophospholipides (APLs) du feuillet cytoplasmique de la membrane plasmique des eucaryotes est important pour plusieurs fonctions (Fig. 1). Par exemple, il a été montré que l'activité de la protéine kinase C était dépendante de l'interaction entre la PKC et la PS (voir revue de (Hannun et al., 1986; Zachowski, 1993)). Il a aussi été montré que la présence d'APLs sur le feuillet interne des membranes était importante pour permettre la fusion entre deux surfaces lipidiques. À l'inverse, la dissipation de l'asymétrie et l'externalisation des APLs est impliquée dans de nombreux processus :

- La coagulation sanguine (Lentz, 2003)
- La reconnaissance des cellules entrées en apoptose par les macrophages (Fadok et al., 2000)
- L'entrée de virus dans les cellules hôtes (Mercer and Helenius, 2008)
- La formation de myotubes (van den Eijnde et al., 2001)
- La capacitation des spermatozoïdes (Flesch et al., 2001)

- La transduction du signal (Yeung et al., 2008)
- Le cycle cellulaire (Emoto and Umeda, 2000)
- La polarité cellulaire (Iwamoto et al., 2004)

b) Création et maintien de l'asymétrie des lipides membranaires

Lorsqu'on analyse l'asymétrie transversale des lipides au sein de diverses membranes cellulaires, on observe qu'il existe une gradation de l'asymétrie entre les différents organelles, avec les membranes du réticulum endoplasmique (RE) qui sont symétriques tandis que les membranes du *trans*-Golgi et la membrane plasmique (MP) sont asymétriques (Fig. 2) (Holthuis and Levine, 2005).

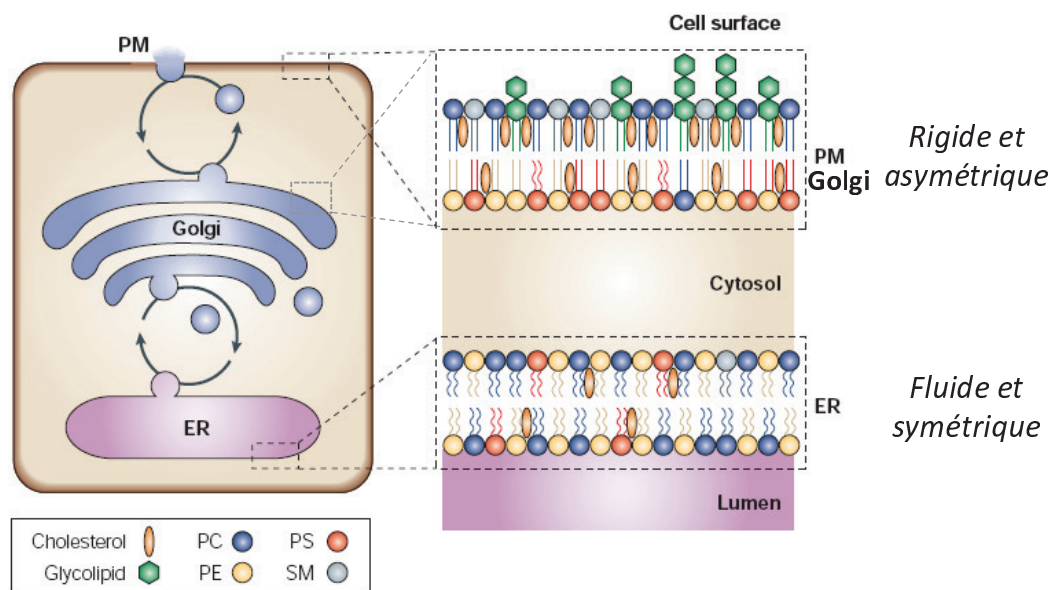


Figure 3. Distributions des lipides dans les membranes (adapté de (Holthuis and Levine, 2005)).

La répartition des lipides dans les membranes varie selon leur localisation. La membrane est symétrique au niveau du réticulum endoplasmique (ER), lieu de synthèse des lipides, et asymétrique au niveau des membranes du Golgi et de la membrane plasmique (PM).

La synthèse des lipides s'effectue sur la face cytosolique du RE et les lipides doivent être transportés sur la face externe à une vitesse proche de celle de leur production de manière non sélective, afin d'assurer la biogenèse des membranes. Or, dans les membranes modèles, si la diffusion latérale des phospholipides est rapide, la diffusion transverse (passive) des lipides possédant une tête polaire est lente (heures ou jours pour la PC), du fait du problème posé par le passage de la tête polaire à travers la partie hydrophobe de la membrane. En revanche, les lipides qui ne possèdent qu'une tête polaire minimale diffusent plus rapidement à travers les membranes (secondes ou minutes pour le diacylglycérol (DAG)) (Fig. 3) (Holthuis and Levine, 2005).

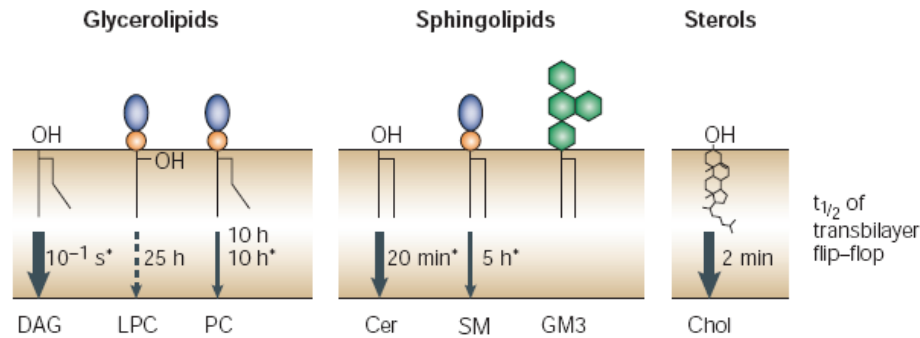


Figure 3. Diffusion passive des lipides au travers d'une membrane modèle (Holthuis and Levine, 2005).

La Figure indique le $t_{1/2}$ de la diffusion passive de différents lipides à travers une membrane modèle. L'épaisseur de la flèche est proportionnelle à la vitesse de transport. *: $t_{1/2}$ mesuré avec un analogue du lipide considéré. DAG : diacylglycérol. LPC : lysophosphatidylcholine. PC : phosphatidylcholine. Cer : céramide. SM : sphingomyéline. GM3 : mono sialoganglioside simple. Chol : cholestérol.

À cause de cette diffusion transverse passive lente pour les phospholipides, Bretscher a proposé l'existence d'une protéine dans le RE qui faciliterait le « flip-flop » (diffusion transverse bidirectionnelle) de ces lipides (Bretscher, 1973). La protéine responsable d'une telle activité serait ce qu'on appellerait de nos jours une « flip-floppase », transportant rapidement les lipides au fur et à mesure de leur synthèse, indépendamment de l'ATP, de manière non spécifique et bidirectionnelle. Son identité est inconnue. L'observation selon laquelle l'insertion d'hélices α au sein de membranes synthétiques provoque un flip-flop rapide des lipides suggère d'ailleurs que ce n'est peut-être pas une protéine spécifique qui permet ce flip-flop rapide dans le RE (Kol et al., 2003).

Cependant, le flip-flop des lipides induit par ces hélices α est fortement inhibé par la présence de cholestérol, un abondant composant de la membrane plasmique des eucaryotes, et cet effet est peut-être dû à l'augmentation de la compacité et de la rigidité des membranes à travers lesquelles la tête polaire doit trouver un chemin (Fig. 2) (Kol et al., 2003). Dans ces membranes à flip-flop spontané lent, des protéines particulières sont donc probablement nécessaires pour créer et maintenir l'asymétrie des lipides : des « flippases » ou des « floppases », dépendantes de l'ATP, sélectives et unidirectionnelles, qui consomment de l'ATP pour transporter un lipide spécifique contre son gradient de concentration. La première activité de flippase dépendante de l'ATP a été décrite en 1984 dans la membrane plasmique des érythrocytes. Cette flippase transporte spécifiquement un analogue de la PS et, dans une moindre mesure, de la PE, et elle a été nommée aminophospholipid translocase (« APLT ») (Seigneuret and Devaux, 1984). Des arguments en faveur de l'appartenance de l'APLT aux ATPases de type P ont été avancés : le fait que le substrat soit le Mg^{2+} -ATP, que l'ATP se fixe indépendamment du PL, et que l'APLT soit inhibée par le vanadate et les composés fluorés (Seigneuret and Devaux, 1984). En 1989, une activité de flippase a aussi été détectée dans les granules chromaffins bovins (Zachowski et al., 1989). Cette flippase, nommée ATPase II, a été identifiée comme étant le produit du gène ATP8A1. Un alignement de séquence a permis de déterminer que l'orthologue de cette protéine dans la levure était Drs2p, une protéine localisée au niveau du TGN (trans-Golgi network) (Tang et al., 1996). L'analyse de la séquence de ces protéines a permis de déterminer qu'elles appartenaient effectivement à la famille des ATPases de type P, et elles ont fondé une nouvelle sous-famille, les ATPases de type P4 (ATPases P4).

I.2 Les ATPases de type P

a) Les ATPases de type P et leurs différentes sous-familles

Les ATPases de type P sont des protéines membranaires intégrales principalement impliquées dans le transport d'ions et présentes dans tout le règne du vivant. Le transport d'ions contre leur gradient de concentration nécessite de l'énergie, fournie par l'hydrolyse de l'ATP. La particularité de ces ATPases est la formation à partir de l'ATP, au cours du cycle catalytique, d'un intermédiaire phosphorylé, sur un résidu aspartate conservé parmi toutes les ATPases de type P. Cette particularité a donné son nom à cette famille de protéines : les ATPases « de type P ». Leurs extrémités N- et C-terminales sont généralement localisées dans le cytoplasme. L'alignement de séquences de nombreuses ATPases de type P a permis de faire ressortir des motifs très conservés, notamment la séquence consensus hautement conservée « DKTG », où D est l'aspartate phosphorylé au cours du cycle catalytique (Axelsen and Palmgren, 1998; Catty et al., 1997; Møller et al., 1996). Cet alignement de séquences a permis de classer les ATPases de type P selon leurs spécificités de transport (Fig. 4), et il existe 5 sous-familles d'ATPase de type P (Kuhlbrandt, 2004; Palmgren and Nissen, 2011) :

- Les ATPases de type P1 : elles sont classées en 2 sous-groupes, 1A et 1B. Le sous-groupe 1A contient notamment une ATPase bactérienne de transport du K^+ , Kdp (Palmgren and Nissen, 2011). Les substrats transportés par les ATPases du sous-groupe 1B sont les métaux dits « lourds » ou les métaux de transition (cuivre, argent, zinc, cadmium ou plomb), et leurs fonctions sont d'une part de fournir les métaux nécessaires au fonctionnement des métalloprotéines et d'autre part d'exporter les métaux toxiques hors de la cellule. La particularité de cette famille est de posséder un domaine de fixation des métaux (MBD) sur une de ses extrémités terminales. Pour les ATPases des organismes procaryotes, le MBD est généralement localisé sur l'extrémité N-terminale et des structures à basse résolution indiquent que ce domaine est en contact avec les domaines N/P (Wu et al., 2008). Ceci est d'ailleurs confirmé par des expériences de biochimie classique (Gonzalez-Guerrero et al., 2009; Tsivkovskii et al., 2001). Il a été proposé que les domaines MBD, de par leur interaction avec les domaines N/P, agissent comme régulateurs de l'activité des ATPases P1B : dans le cas spécifique de l'ATPase- Cu^+ humaine issue du gène *ATP7B*, il semble que l'interaction entre domaines MBD et N/P soit auto-inhibitrice et que la fixation de Cu^+ lève cette auto-inhibition de l'ATPase (Tsivkovskii et al., 2001). Il a également été proposé que les ions Cu^+ soient au préalable transférés du domaine MBD aux sites membranaires de haute affinité, mais la localisation du domaine MBD et le fait que la délétion du MBD dans beaucoup d'ATPases procaryotes n'ait que des effets marginaux sur l'activité ne soutiennent pas cette hypothèse (Bal et al., 2001; Fan and Rosen, 2002). Des mutations des gènes codant les ATPases à cuivre entraînent, chez l'homme, les maladies de Menkes ou de Wilson. La maladie de Menkes correspond à un trouble du métabolisme du cuivre qui résulte de la mutation du gène *ATP7A*, codant une enzyme responsable du transport intracellulaire du cuivre. Des mutations de ce gène entraînent un défaut d'absorption du cuivre au niveau des intestins (Vulpe et al., 1993). Les principales manifestations sont neurologiques, et accompagnées d'un changement de la texture des cheveux caractéristique de la maladie. La maladie de Wilson, quant à elle, résulte de la mutation du gène *ATP7B*, codant une enzyme responsable du transport intracellulaire du cuivre dans le foie et le système nerveux (Tanzi et al., 1993).

- Les ATPases de type P2 : elles sont classées en trois sous-groupes : 2A, 2B et 2C. Le substrat de transport des sous-groupes 2A et 2B est le calcium tandis que le sous-groupe 2C est représenté par des ATPases de transport Na^+/K^+ ou H^+/K^+ . Les sous-groupes 2A et 2B sont différenciés par 4 points : Le sous groupe 2B possède un domaine de fixation à la calmoduline sur une de ses extrémités terminales, et ce domaine régule l'activité de l'ATPase ; le sous-groupe 2B ne transporte qu'un seul calcium ; la formation de dérivé phosphorylé à l'état stationnaire est augmentée par la présence de lanthane pour le sous-groupe 2B, contrairement aux autres ATPases de type P, dont le sous-groupe 2A. Le sous-groupe 2C possède la particularité de requérir la présence d'une sous-unité régulatrice pour son fonctionnement (sous-unité β) (Geering, 2001). La découverte de l'ATPase- Na^+/K^+ par l'équipe de Skou en 1957 lui a valu le prix Nobel (Skou, 1957). Serca1a, du sous-groupe 2A, est la première ATPase de type P pour laquelle la structure en 3 dimensions a été obtenue à haute résolution (Toyoshima et al., 2000).

- Les ATPases de type P3 : Ces ATPases, que l'on trouve dans la membrane plasmique des plantes et microorganismes, exportent des protons vers le milieu extracellulaire afin de créer un gradient électrochimique qui va permettre l'assimilation de nutriments. Par exemple, chez les plantes, une exposition à la lumière entraîne une chaîne de réactions aboutissant, via la phosphorylation du domaine d'auto-régulation de l'extrémité C-terminale de l'ATPase à proton de la membrane plasmique des cellules de garde des stomates, à l'activation de cette protéine. Le gradient électrochimique résultant entraîne l'absorption d'eau et d'ions par les cellules de garde. Les cellules vont alors grossir et permettre l'ouverture des pores des stomates, ce qui va permettre aux plantes d'absorber le CO_2 (Merlot et al., 2007).

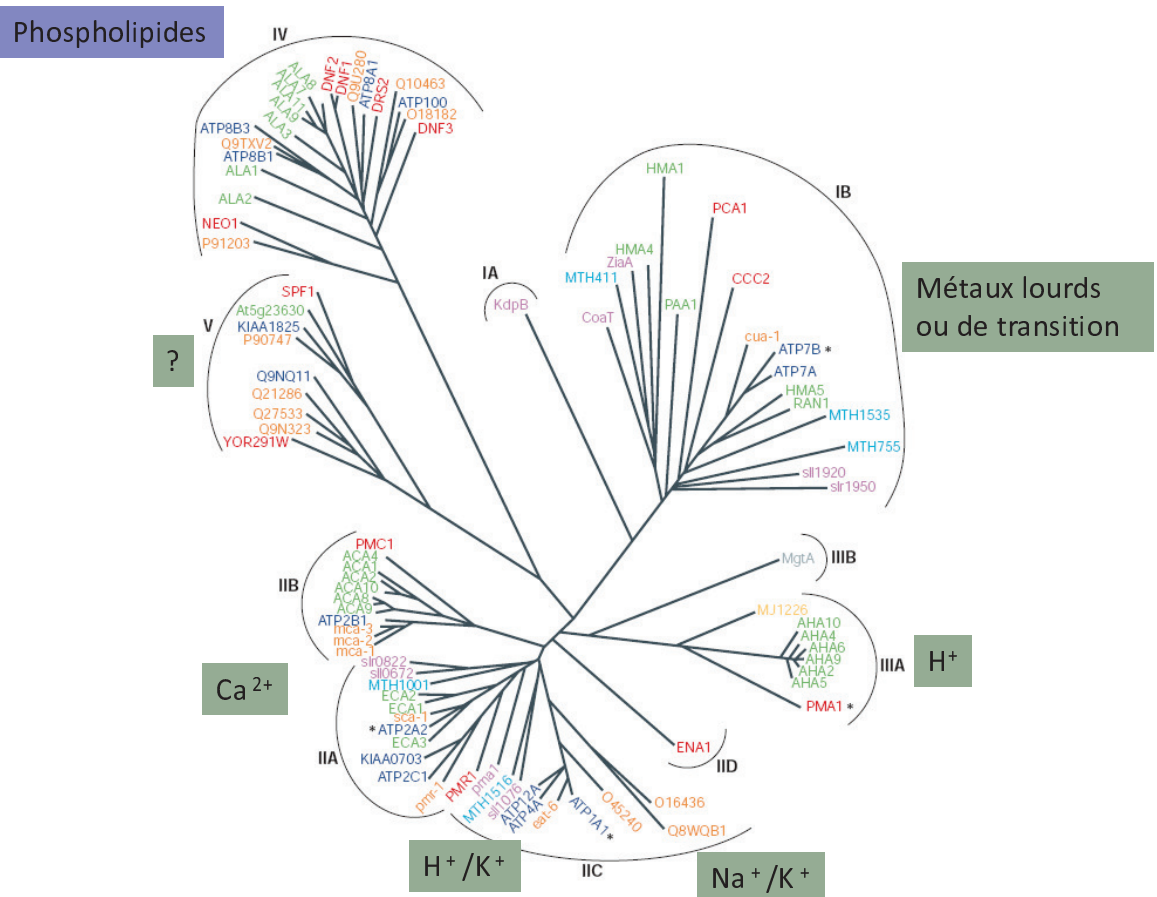


Figure 4. Arbre phylogénétique de la famille des ATPases de type P (adapté de (Kuhlbrandt, 2004)).
 Le substrat de transport est indiqué dans le cadre bleu. Le nom des gènes est coloré selon l'espèce : en vert, gènes d'*Arabidopsis thaliana* ; en orange, gènes de *Caenorhabditis elegans* ; en gris, gènes de *Escherichia coli* ; en bleu foncé, gènes d'*Homo sapiens* ; en bleu clair, gènes de *Methanobacterium thermoautotrophicum* ; en jaune, gènes de *Methanococcus jannaschii* ; en violet, gènes de *Synechocystis PCC6803* ; et en rouge, gènes de *Saccharomyces cerevisiae*. Classification effectuée par Axelsen et Palmgren en 1998.

- Les ATPases de type P4 : leur substrats de transport semblent être des phospholipides et elles ne sont présentes que chez les eucaryotes (Axelsen and Palmgren, 1998). Les ATPases de type P4 semblent nécessiter la présence d'une sous-unité régulatrice, les protéines CDC50 (Lopez-Marques et al., 2011). Ces ATPases seront décrites plus précisément ci-après.

- Les ATPases de type P5 : leur substrat de transport n'est pas encore défini. Il existe deux sous-groupes 5A et 5B, localisés au niveau du RE (5A) ou au niveau des lysosomes, des vacuoles ou de la membrane plasmique (5B) (Sorensen et al., 2010). Il a été proposé que la fonction de flippase au niveau du RE soit réalisée par les protéines appartenant au sous-groupe 5A (Poulsen et al., 2008b), mais cette proposition est un peu contradictoire avec l'idée (voir plus haut) que ce transport dans le RE est indépendant de l'ATP.

b) Les caractéristiques structurales des ATPases de type P

Les structures cristallographiques de l'ATPase- Ca^{2+} Serca1a de lapin (Toyoshima et al., 2000), de l'ATPase- Na^+/K^+ de porc (Morth et al., 2007), de l'ATPase- H^+ de plantes AHA2 (Pedersen et al., 2007), et de l'ATPase- Cu^+ de *Legionella pneumophila* CopA (Gourdon et al., 2011) ont déjà été obtenues (Fig. 6), et malgré un faible degré de conservation de séquence, les structures de ces différentes sous-familles d'ATPases sont similaires. Les ATPases de type P sont constituées, en général, de 4 domaines. 3 de ces domaines sont cytoplasmiques, les domaines A, N, P tandis qu'un domaine est transmembranaire, M, parfois séparé en deux sous-domaines T et S (Fig. 5). Certaines ATPases de type P présentent un cinquième domaine (non visible sur la Figure 5), nommé domaine R et situé à l'extrémité N- et/ou C-terminale de l'ATPase (Kuhlbrandt, 2004; Palmgren and Nissen, 2011).

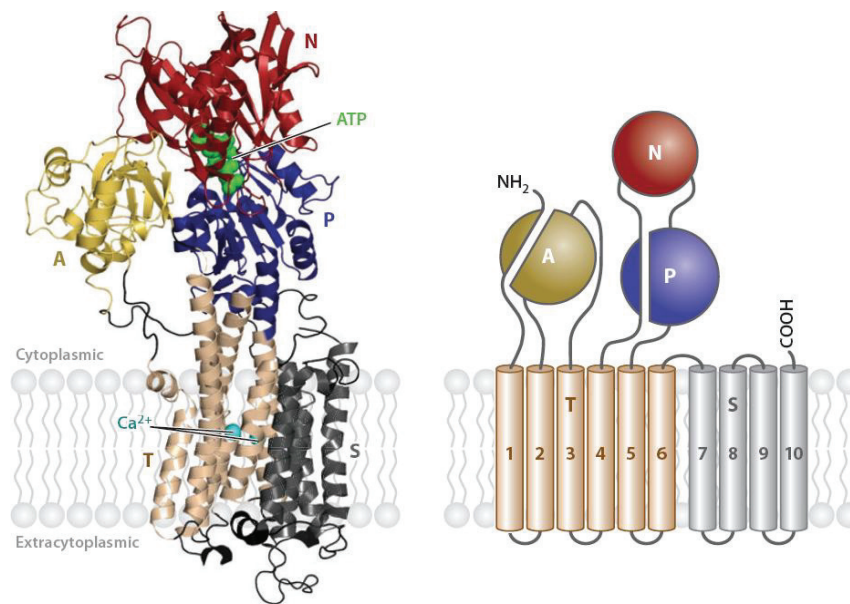


Figure 5. Structure tridimensionnelle et topologie de l'ATPase- Ca^{2+} (Palmgren and Nissen, 2011).

À gauche : Structure obtenue pour Serca1a (PDB : 1T5S). La pompe est organisée en trois domaines cytoplasmiques (A, N et P), et un domaine membranaire divisible en 2 parties (T et S). Le domaine N lie l'ATP et possède un rôle de kinase, qui va phosphoryler le domaine P. Le domaine A joue le rôle de phosphatase en déphosphorylant le domaine P. Les ions transportés (Ca^{2+} dans ce cas-là) se fixent au milieu du domaine T et le site de fixation est accessible alternativement, au cours du cycle, soit par le cytoplasme soit par le milieu extérieur. À droite : Représentation simplifiée de la structure présentée à gauche. Les différents domaines sont représentés par des lettres. Le domaine A est constitué de l'extrémité N-terminale et de la première boucle cytoplasmique. Le domaine N est une insertion dans le domaine P. Les domaines N et P sont constitués par la seconde boucle cytoplasmique. Le domaine membranaire est constitué de 10 segments transmembranaires dont les 6 premiers constituent le domaine T et les 4 derniers constituent le domaine S.

- Le domaine P (pour « phosphorylation ») contient la séquence conservée DKTG où D est l'aspartate phosphorylé. Ce domaine contient deux autres séquences TGDN et GDGXND impliquées dans la coordination du magnésium associé à l'ATP. Ce domaine est constitué de deux parties, séparées par le domaine N, dont une est reliée à l'hélice M4 tandis que l'autre est reliée à l'hélice M5.

- Le domaine N (pour « nucleotide ») fixe l'ATP et permet la phosphorylation du domaine P. Il est inséré au sein du domaine P et c'est le domaine dont la séquence est la plus variable parmi les ATPases de type P.

- Le domaine A (pour « actuator ») est constitué de la boucle reliant les hélices M2 et M3 et des acides aminés N-terminaux situés en amont du premier segment transmembranaire. Il contient le motif TGES qui est hautement conservé au sein des ATPases de type P et qui est impliqué dans la déphosphorylation de l'aspartate. Ce domaine agit donc comme une phosphatase. Ce domaine est très flexible, ce qui lui permet des mouvements de grande amplitude.

- Le domaine M (pour « membrane ») est constitué des hélices transmembranaires au sein desquelles se situe le site de fixation des ions transportés. Ce domaine est constitué du domaine de transport (T), très flexible et impliqué dans le transport des ions, et le domaine de support (S), plus rigide. La séquence des domaines M des différentes ATPases est très peu conservée.

- Le domaine R (pour « regulatory »), présent pour certaines ATPases, est un domaine qui permet la *cis*-régulation de certaines ATPases de type P. Il peut être situé à l'extrémité N- ou C-terminale ou aux deux extrémités. Il agit comme un domaine autoinhibiteur en interagissant avec le reste de la pompe.

Certaines ATPases de type P possèdent des sous-unités additionnelles requises pour leur adressage et/ou leur fonction (Kuhlbrandt, 2004; Palmgren and Nissen, 2011). Par exemple l'ATPase- Na^+/K^+ possède une sous-unité β , constituée d'un seul segment transmembranaire et d'un large domaine cytoplasmique. Elle est importante pour l'adressage du complexe et module son affinité pour le K^+ (Geering, 2001). Dans certaines cellules, l'ATPase- Na^+/K^+ et sa sous-unité β interagissent avec les protéines de la famille FXYD, nommées aussi sous-unités γ . Ces sous-unités γ sont de petits polypeptides constitués d'un seul segment transmembranaire. Dans le cas de l'ATPase Na^+/K^+ du rein, cette sous-unité régule l'affinité de l'ATPase pour le Na^+ (Geering et al., 2003). Dans le muscle squelettique, un petit peptide régule aussi l'activité de l'ATPase Ca^{2+} Serca1a : la sarcolipine; dans le cœur, c'est le phospholamban qui régule l'activité de Serca2a (MacLennan et al., 2003; MacLennan and Kranias, 2003).

c) Les caractéristiques fonctionnelles des ATPases de type P

La conservation de la structure des ATPases de type P (Fig. 6) et des séquences impliquées dans la catalyse suggèrent un mécanisme de transport commun à toute cette famille. L'accumulation des données fonctionnelles et structurales a permis de proposer un modèle du cycle catalytique et de transport des ions par les ATPases de type P, basé sur le schéma dit de « Post-Albers » (Fig. 7, A&B). (Kuhlbrandt, 2004).

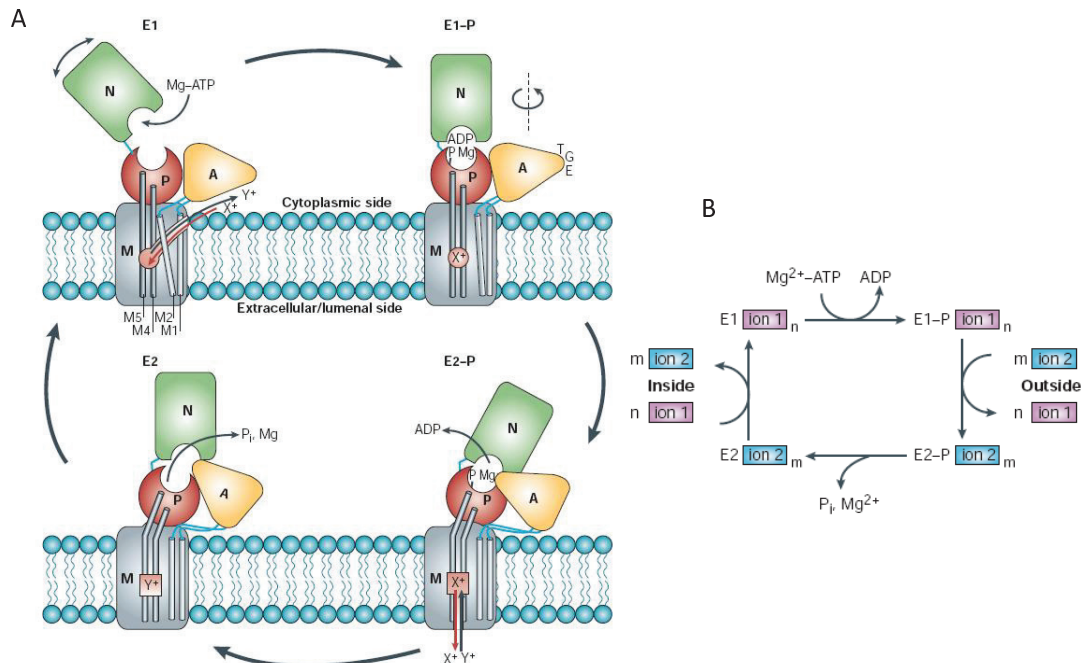


Figure 7. Schéma du cycle catalytique des ATPases de type P, dit de « Post-Albers » (Kuhlbrandt, 2004).

A : schéma du cycle catalytique des ATPases de type P incluant les mouvements des différents domaines. B : schéma général du cycle catalytique des ATPases de type P. A, N, P et M correspondent aux différents domaines de l'ATPase. M1, M2, M4 et M5 représentent les segments transmembranaires impliqués dans le transport des ions. X et Y représentent l'ion 1 et l'ion 2, respectivement. (NB : l'accessibilité du site catalytique à l'ADP indiquée sur le schéma A pour les formes « E1-P » et « E2-P » n'est pas forcément la plus heureuse, dans la mesure où l'ADP est réputé se dissocier de la protéine lorsqu'elle est sous la forme « E1-P »...)

Au début de ce cycle, l'ion 1 (ou X, Fig. 7A et 7B) rejoint son site de fixation de haute affinité *via* un canal ouvert sur le cytoplasme, et y remplace l'ion 2 (ou Y, Fig. 7A et 7B) qui vient d'être relargué dans le cytoplasme (peut-être par le même canal qui servira à l'entrée de l'ion 1). La protéine est alors sous la conformation dite « E1 ». La fixation de l'ion 1 induit des réarrangements du domaine P qui génèrent un site de fixation au Mg^{2+} proche de l'aspartate et la phosphorylation de ce dernier par le phosphate en position γ de l'ATP. On obtient alors la forme « E1-P », qui relargue son ADP et qui est dite de « haute énergie » parce que l'addition d'ADP à ce phosphoenzyme permet de reverser la réaction et de reformer de l'ATP. Sous cette forme, l'ion 1 n'a plus accès à la surface cytoplasmique de la membrane ; il n'a pas non plus accès à l'autre côté de la membrane : il est dit « occlus ». S'opère alors une transition spontanée de la forme « E1-P » à une forme « E2-P », dite de « basse énergie », forme à partir de laquelle on ne peut plus reformer d'ATP par addition d'ADP. Cette transition est caractérisée par la rotation du domaine A. Cette rotation permet l'approche du motif conservé « TGES » vers l'aspartate phosphorylé pour sa déphosphorylation ultérieure, l'ouverture

d'un canal vers la face externe de la membrane et la transformation des sites de fixation du calcium en sites de basse affinité. Pour l'ATPase- Ca^{2+} Serca1a, cette transition est en général la plus lente du cycle catalytique et représente donc l'étape limitante. L'ion 1 est alors libéré du côté externe et l'ion 2 peut se fixer sur des sites qui pour lui sont alors de haute affinité. La fixation de l'ion 2 entraîne son occlusion. Les mouvements entraînant cette occlusion sont transmis au domaine P et cela permet l'hydrolyse de la liaison acyl-phosphate par une molécule d'eau. Le Mg^{2+} et le Pi sont ensuite libérés. On obtient ainsi la forme « E2 », déphosphorylée, dans laquelle l'ion 2 est toujours occlus au sein des segments transmembranaires. Le domaine A s'éloigne du domaine P et l'ATPase retourne sous la forme « E1 ». Ce déplacement est accompagné de mouvements au sein du domaine M qui font disparaître le site de haute affinité pour l'ion 2, ouvrent un canal de sortie pour celui-ci et reforment le site de haute affinité pour l'ion 1. Un cycle peut ainsi recommencer.

d) La régulation des ATPases de type P

Les ATPases de type P, du fait de leur rôle central dans le transport des ions ou des lipides, doivent être contrôlées rapidement, localement et fortement afin de pouvoir répondre aux différents stimuli qu'elles reçoivent. Cette régulation peut s'effectuer à plusieurs niveaux :

- Régulation de l'expression du gène : par exemple, l'expression de l'ATPase- H^+ de la membrane plasmique des levures, Pma1p, est régulée par les facteurs de transcription Rap1 et Gcr1, eux-mêmes régulés par le métabolisme du glucose. Le facteur de transcription Gln3, quant à lui, régule l'expression de Pma1p en fonction des besoins en ammonium. En outre, l'expression de Pma1p est aussi régulée par le facteur de transcription Mcm1, ce qui relie Pma1p à la régulation du cycle cellulaire et de l'intégrité de la paroi cellulaire (Portillo, 2000).

- Régulation par redistribution de la protéine : par exemple, lorsque les cellules CHO résistantes au cuivre sont cultivées sur un milieu riche en cuivre, l'ATPase- Cu^+ du Golgi de Hamster MNK (ou ATP7A) est relocalisée dans les vésicules de sécrétion et à la membrane plasmique des cellules (Petrus et al., 1996). L'ATPase est rapidement recyclée vers les membranes du Golgi lorsque les cellules sont placées à nouveau sur un milieu appauvri en cuivre.

- Régulation par des interactions protéines-protéines : par exemple, les protéines de la famille des Sercas sont régulées par le phospholamban (PLN) ou la sarcolipine (SLN) (MacLennan et al., 2003; MacLennan and Kranias, 2003). Le PLN, petite protéine de ~6 kDa, est exprimé dans les cellules du muscle cardiaque où il peut moduler l'activité de Serca2a en se liant réversiblement lorsqu'il est déphosphorylé. En revanche, lorsque le PLN est phosphorylé, il n'inhibe plus l'activité de Serca2a. La SLN inhibe plus particulièrement Serca1a. Un autre exemple est la régulation de l'ATPase- Na^+/K^+ par ses sous-unités β et γ . La sous-unité β est une protéine membranaire de ~55 kDa, glycosylée, possédant des ponts disulfures et un seul segment transmembranaire. Elle semble être essentielle pour l'assemblage et l'insertion correcte dans la membrane de la sous-unité α mais aussi pour déterminer les propriétés de transport de la pompe (Geering, 2001). La sous-unité γ appartient à la famille des protéines FXYD, qui sont des protéines membranaires à un seul segment transmembranaire et portant le motif FXYD et 3 autres résidus conservés. Les différentes isoformes des sous-unités γ semblent réguler la fonction de la sous-unité α , de façon adaptée à la physiologie du tissu dans lequel elles sont exprimées (Geering et al., 2003).

- Régulation par *cis*-régulation : Les ATPases de type IB, IIB, IIC et IIIB possèdent aussi des domaines de *cis*-régulation au niveau de leurs propres extrémités N- ou C-terminales : ce sont les domaines R (« Domaine régulateur »). Ils peuvent être présents à l'extrémité N-terminale, comme

pour l'ATPase- Ca^{2+} de plante, Aca2p, qui semble être régulée par la fixation de la calmoduline sur les premiers résidus de son extrémité N-terminale {Harper, 1998 #184}. Ils peuvent aussi être présents sur l'extrémité C-terminale, comme pour l'ATPase- H^+ de levure, Pma1p, dont l'extrémité C-terminale est impliquée dans la régulation de la protéine par le glucose (Portillo et al., 1989). L'implication des deux extrémités dans la régulation a également déjà été observée pour l'ATPase- H^+ de la membrane plasmique des plantes, *AHA2* (Ekberg et al., 2010). Ces domaines R semblent auto-inhiber l'ATPase en empêchant le mouvement des autres domaines (A, N et P).

En ce qui concerne *AHA2*, l'ATPase- H^+ de la membrane plasmique des plantes (Ekberg et al., 2010), son extrémité C-terminale contient deux régions auto-inhibitrices, et des sites de phosphorylation par des kinases non identifiées. Dans l'état inhibé, l'extrémité C-terminale s'enroule autour du domaine A de l'ATPase et inhibe le mouvement des domaines (A, N et P) et/ou l'accès des protons aux sites de fixation dans la membrane. L'extrémité N-terminale, quant à elle, s'enroulerait autour de l'extrémité C-terminale et la protégerait des modifications post-traductionnelles. L'activation de l'ATPase commencerait par une déstabilisation de l'extrémité N-terminale qui serait due soit à une modification post-traductionnelle, soit à la fixation d'un ligand ou encore à l'approche d'une kinase. Cette déstabilisation de l'extrémité N-terminale rendrait alors l'extrémité C-terminale accessible pour des modifications (par exemple par la kinase). La phosphorylation du résidu thréonine en position 947 induirait alors la fixation de la protéine régulatrice 14-3-3 sur l'extrémité C-terminale. Cette interaction causerait le détachement des domaines auto-inhibiteurs de leur site de fixation intramoléculaire et entraînerait la transformation de l'enzyme d'un état de faible activité vers un état de haute activité (Ekberg et al., 2010).

I.3 Les ATPases P4 et la famille des protéines CDC50

a) Généralités sur les ATPases P4 et les protéines CDC50

Les ATPases P4 existent seulement chez les eucaryotes. Par exemple, il existe 14 ATPases P4 chez l'Homme et 5 ATPases P4 chez la levure (Tableau 1, pages suivantes).

Tableau 1. Les principaux complexes ATPase P4/protéine CDC50.

Organismes	ATPase P4	Sous-unités CDC50 associées	Substrat(s)	Localisation	Références
<i>Homo sapiens</i>	ATP8A1	CDC50A/B	PS (PE)	MP, Golgi	(Bryde et al., 2010) ; (van der Velden et al., 2010) ; (Paterson et al., 2006)
	ATP8A2	CDC50A	PS (PE)	Golgi	(van der Velden et al., 2010) ; (Coleman et al., 2009; Coleman and Molday, 2011)
	ATP8B1	CDC50A/B	PS (PE)	MP	(Bryde et al., 2010) ; (van der Velden et al., 2010) ; (Paulusma et al., 2008)
	ATP8B2	CDC50A/B	ND	MP	(Bryde et al., 2010) ; (van der Velden et al., 2010)
	ATP8B3	-	ND	Golgi, RE, vésicules pro-acrosomales, acrosomes	(van der Velden et al., 2010) ; (Gong et al., 2009)
	ATP8B4	CDC50A/B	ND	MP	(Bryde et al., 2010) ; (van der Velden et al., 2010)
	ATP9A	-	ND	TGN, EP, RE	(Takatsu et al.)
	ATP9B	-	ND	TGN	(Takatsu et al.)
	ATP10A	CDC50A	ND	MP	(Takatsu et al.)
	ATP10B	CDC50A	ND	RE	(Takatsu et al.)
	ATP10D	CDC50A	ND	MP	(Takatsu et al.)
	ATP11A	CDC50A	ND	MP, EP, RE	(Takatsu et al.)
	ATP11B	CDC50A	ND	RE	(Takatsu et al.)
	ATP11C	CDC50A	PS	MP	(Takatsu et al., 2011;

					Yabas et al., 2011)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Dnf1p	Lem3p	PC, PE (PS)	MP	(Hua et al., 2002; Pomorski et al., 2003)
	Dnf2p	Lem3p	PC, PE (PS)	MP	(Hua et al., 2002; Pomorski et al., 2003)
	Dnf3p	Crf1p	PC (PE)	TGN, VS	(Natarajan et al., 2004)
	Drs2p	Cdc50p	PS (PE)	TGN, VS	(Alder-Baerens et al., 2006; Natarajan et al., 2004)
	Neo1p	-	ND	TGN, endosomes	(Wicky et al., 2004)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	ALA1	ND	PS (PE)	ND	(Gomes et al., 2000)
	ALA2	ALIS1/3/5	PS	CPV	(Poulsen et al., 2008a)
	ALA3	ALIS1/3/5	PC, PE (PS)	Golgi	(Lopez-Marques et al., 2010; Poulsen et al., 2008a)
<i>Caenorhabditis elegans</i>	TAT-1	CHAT-1	PS	MP, EP, RE, ET	(Chen et al., 2010; Darland-Ransom et al., 2008; Ruaud et al., 2009)
<i>Leishmania donovani</i>	LdMT	LdRos3	PC, PE et PS	MP	(Perez-Victoria et al., 2006)

PS : phosphatidylsérine. PC : phosphatidylcholine. PE : phosphatidyléthanolamine. ND : non déterminé. TGN : trans-Golgi network. MP : membrane plasmique. EP : endosomes précoces. RE : réticulum endoplasmique. CPV : compartiment pré-vacuolaire. VS : vésicules de sécrétions post-Golgi. ET : endosomes tardifs. Les substrats entre parenthèses sont des substrats qui sont transportés eux aussi, mais moins efficacement que celui qui n'est pas entre parenthèses.

Il n'existe pas, à ce jour, de structure cristallographique pour une ATPase P4, mais ces ATPases P4 ont probablement une structure similaire à celle des ATPases de type P déjà cristallisées (Puts and Holthuis, 2009). Les ATPases P4 sont prédites pour contenir 10 segments transmembranaires. Elles possèdent généralement des extrémités N- et C-terminales plus longues que les ATPases de type P2 (Fig. 8).

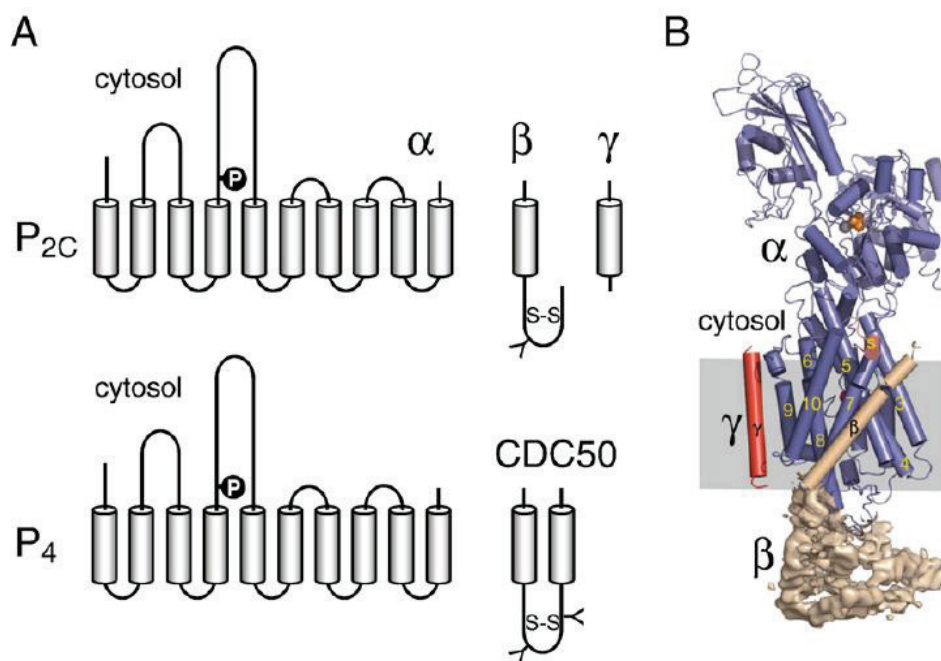


Figure 8. Représentation de la topologie des ATPases de type P_{2C} et P₄ et de leur sous-unités associées (Puts and Holthuis, 2009).

A : topologie des ATPases de type P_{2C} et P₄ et de leur sous-unités associées. La position de l'aspartate phosphorylé au cours du cycle catalytique est repérée par le signe « P ». S-S : pont disulfure. Y : site de glycosylation. B : structure des sous-unités α, β et γ de l'ATPase Na⁺/K⁺ (Morth et al., 2007).

Si l'on suppose que les ATPases P₄ suivent le même mécanisme de transport que les autres ATPases de type P, alors cela signifie que le transport de lipides a lieu au cours de la déphosphorylation de la protéine, puisque le transport de lipides s'effectue du feuillet externe vers le feuillet cytoplasmique de la membrane. Ainsi, la fixation du lipide sur les ATPases P₄ devrait accélérer l'étape de déphosphorylation de la protéine. Le lipide tiendrait donc le rôle de l'ion 2 du schéma dit de « Post-Albers » présenté sur la Figure 7B. En regardant ce schéma, on se demande quel est l'équivalent de l'ion 1 pour les ATPases P₄ ? Est-ce un ion, ou bien la fixation d'un ligand 1 n'est-elle pas nécessaire du fait de la présence d'acides aminés jouant le rôle de ligand constitutif (ce dernier cas est décrit pour l'ATPase-H⁺ de plante, qui ne transporte pas d'ion 2 (Pedersen et al., 2007), et aussi pour quelques mutants de l'ATPase H⁺/K⁺) ? Au contraire, s'il faut un ion 1 et sachant que les ions 1 et 2 de Serca1a se fixent dans la même poche (au sens large), comment l'équivalent de cette poche dans une ATPase P₄ pourrait-elle prendre en charge, à la fois un ion et un phospholipide ? Les acides aminés polaires et chargés localisés dans la membrane et impliqués dans le site de fixation des ions par les ATPases P₂ sont remplacés, chez les ATPases P₄, par des acides aminés hydrophobes (Tang et al., 1996). Cependant, on peut se demander comment un site de fixation pourrait permettre le passage à la fois d'une tête polaire de lipide et d'une queue hydrophobe, puisque cela ferait intervenir deux types d'interaction, et aussi comment ce site de fixation pourrait discriminer entre les différentes têtes polaires et aussi entre des phospholipides et des sphingolipides. L'explication pourrait provenir de l'existence de sous-unités associées aux ATPases P₄, les protéines de la famille des protéines CDC50.

Les protéines CDC50 sont constituées de 2 segments transmembranaires séparés par une large boucle extracellulaire, qui contient des sites potentiels de glycosylation et des ponts disulfures (Fig. 8) (Puts and Holthuis, 2009; Puts et al., 2012). Il existe, par exemple, 3 protéines CDC50 chez l'homme pour 14 séquences d'ATPases P4, et 3 protéines CDC50 chez la levure pour 5 ATPases P4. Certaines protéines CDC50 interagissent avec plusieurs ATPases P4, comme Lem3p qui interagit avec Dnf1p et Dnf2p, tandis que certaines ATPases P4 n'ont pas de sous-unités associées, comme Neo1p ou ATP9B (Takatsu et al., 2011; Wicky et al., 2004). Comme Dnf1p et Dnf2p interagissent avec la même sous-unité, Lem3p, et transportent les mêmes substrats (PC, PE et PS), il a été suggéré que la sous-unité associée pourrait spécifier la nature du substrat transporté. En effet, il se pourrait que l'interaction avec les protéines CDC50 entraîne la création d'un site de haute affinité pour le substrat transporté au sein de l'ATPase P4 ou que les protéines CDC50 fournissent leurs 2 hélices transmembranaires à un site de fixation auquel contribueraient également les hélices transmembranaires de l'ATPase P4. Il a été montré que l'interaction entre Drs2p et Cdc50p était variable pendant le cycle catalytique de l'ATPase (avec la plus forte interaction lorsque Drs2p est sous la forme E2-P) suggérant une implication de Cdc50p dans la fixation et le transport du substrat (Fig. 9) (Lenoir et al., 2009). À l'inverse, des études ont montré que si l'interaction entre les ATPases P4 et les protéines CDC50 était spécifique chez la levure (voir Tableau 1), elle ne semble pas spécifique chez la plante, et que la spécificité du substrat semblait donc là être portée par l'ATPase (Lopez-Marques et al., 2010).

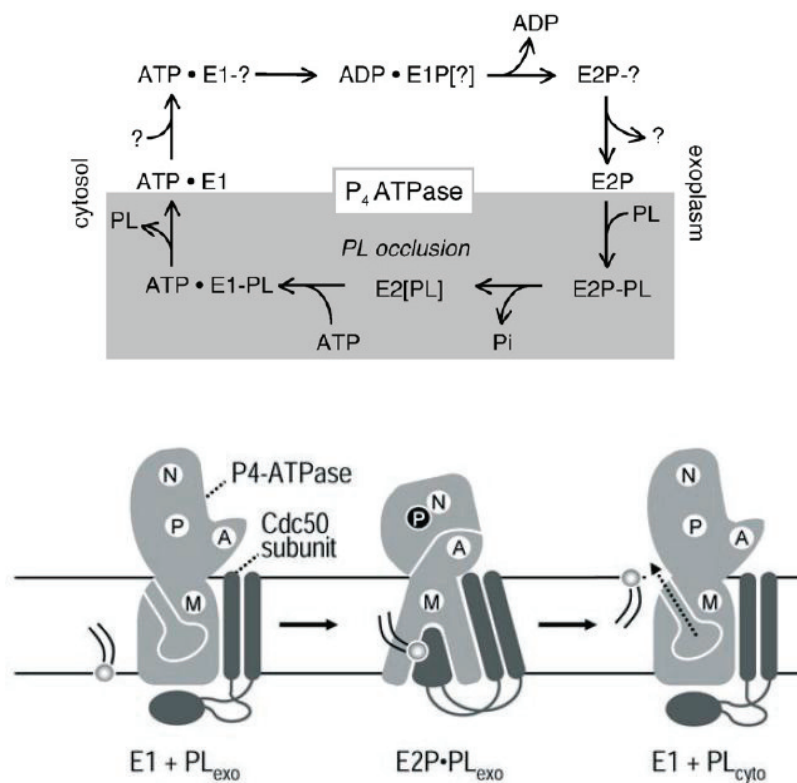


Figure 9. Cycle catalytique hypothétique des ATPases de type P4 (Lenoir et al., 2009; Puts and Holthuis, 2009).

En haut : Schéma du cycle catalytique dit de « Post-Albers » adapté aux ATPases de type P4. En bas : modèle de réarrangement des ATPases de type P4 et de leur sous-unités associées.

Le rôle des protéines CDC50 n'est pas encore bien compris mais il a été montré qu'elles étaient importantes pour la sortie du complexe ATPase P4/CDC50 du RE et pour son adressage correct, suggérant un rôle de chaperon pour les protéines CDC50 (Bryde et al., 2010; Chen et al., 2006; Furuta et al., 2007; Kato et al., 2002; Lopez-Marques et al., 2010; Paulusma et al., 2008; Perez-Victoria et al., 2006; Saito et al., 2004; van der Velden et al., 2010). Comme il a aussi été montré que les protéines CDC50 étaient toujours associées aux ATPases P4 après que le complexe soit arrivé à destination, un rôle des protéines CDC50 dans l'activité des ATPases P4 a été suggéré, comme c'est d'ailleurs le cas pour les sous-unités β des ATPases- Na^+/K^+ et H^+/K^+ . Cette hypothèse d'un rôle des protéines CDC50 dans l'activité des ATPases P4 serait cohérente avec le fait que la formation de dérivé phosphorylé par Drs2p requiert la présence de Cdc50p, avec le fait que certains mutants thermosensibles de Cdc50p, toujours capables d'interagir avec Drs2p, entraînent une altération de l'activité de l'ATPase *in vivo* aux températures non permissives, ou encore avec le fait que certains mutants de Lem3p n'entraînent pas d'altération de la formation du complexe avec Dnf1p ou de son adressage à la membrane plasmique, mais causent un défaut de croissance des levures Δcdc50 (Lenoir et al., 2009; Noji et al., 2006; Takahashi et al., 2011).

Les protéines CDC50 présentent des similarités avec les sous-unités β des ATPases- Na^+/K^+ et H^+/K^+ (Puts and Holthuis, 2009) (Fig. 8). Comme les protéines CDC50, elles portent des sites de glycosylation et des ponts disulfures. Ces sous-unités β sont cependant constituées d'un seul segment transmembranaire et d'une longue extrémité C-terminale, localisée sur la face externe de la membrane (Morth et al., 2007), alors que les protéines CDC50, elles, posséderaient un second segment transmembranaire. Mais l'ATPase- Na^+/K^+ possède, en plus de la sous-unité β , une sous-unité γ constituée elle aussi d'un seul segment transmembranaire, non absolument requise pour l'activité de l'ATPase, mais qui la module (Morth et al., 2007). En outre, il a été montré que les sous-unités β étaient importantes pour la structuration et le trafic de l'ATPase qui leur est associée (Geering, 2001). Il a aussi été montré que les sous-unités β étaient importantes pour la fonction de l'ATPase Na^+/K^+ : en effet, une altération de l'interaction entre ces deux sous-unités ou une réduction des ponts disulfures de la sous-unité β entraîne l'inactivation de l'ATPase (Kawamura et al., 1985; Lutsenko and Kaplan, 1993). Des mutations, dans les segments transmembranaires, qui interrompent l'interaction entre la sous-unité β et l'ATPase, ont abouti à une ATPase possédant une meilleure affinité au Na^+ et plus mauvaise affinité au K^+ et au vanadate (Hasler et al., 2001). Il a donc été suggéré que la sous-unité β stabilise l'ATPase sous la forme E2 et influence l'affinité pour l'ion 2 (K^+) par l'intermédiaire d'interaction avec les boucles M5/M6 et M7/M8. La résolution de la structure de la Na^+/K^+ a montré que la sous-unité β forme une sorte de chapeau couvrant les boucles comprises entre les segments transmembranaires M4/M5 et M7/M8 (Morth et al., 2007). Un rôle similaire de la sous-unité β a été décrit pour l'ATPase H^+/K^+ , suggérant que la sous-unité β est impliquée dans la stabilisation de la forme E2 des ATPases de type $\text{P}_{2\text{c}}$ (Durr et al., 2008).

b) Fonctions des ATPases P4

- Les ATPases P4 semblent être des transporteurs de lipides

Plusieurs études ont montré que les ATPases P4 étaient impliquées dans le transport de phospholipides. Pourtant, le transport de lipides étant difficile à détecter, seul le transport de lipides modifiés par un groupement fluorescent (NBD) sur une des deux chaînes d'acide gras a été démontré (pour revue, (Lopez-Marques et al., 2011)). Dans les levures, il a été montré que Dnf1p et Dnf2p,

localisées dans la membrane plasmique, étaient requises pour le transport de NBD-PC, NBD-PS et NBD-PE (Pomorski et al., 2003). Dnf1p et Dnf2p ont également été impliquées dans le transport de lyso-PC et lyso-PE au niveau de la membrane plasmique (Riekhof and Voelker, 2006; Riekhof et al., 2007). Il a aussi été montré que, dans les levures délétées pour Dnf1p et Dnf2p, le marquage chimique de PS et PE du feuillet externe de la membrane était plus fort que dans les levures sauvages. L'utilisation de sondes spécifiques des phospholipides PS et PE a elle aussi suggéré une exposition de ces phospholipides sur le feuillet externe de la membrane plasmique de ces levures (Chen et al., 2006; Pomorski et al., 2003). La purification des membranes dérivées du *trans*-Golgi de levures exprimant un mutant de Drs2p sensible à la température a montré que l'incubation des membranes à la température non permissive de 37°C entraînait une inhibition du transport de NBD-PS (et NBD-PE) (Natarajan et al., 2004). Autre évidence, il a été montré que les vésicules de sécrétion issues du *trans*-Golgi présentaient une activité de flippase dépendante de la présence de Drs2p et Dnf3p (Alder-Baerens et al., 2006).

Pour d'autres organismes il est aussi décrit que les ATPases P4 de plantes ALA1, ALA2 et ALA3 ainsi que la protéine de souris atp8b5 montrent une activité de transport de NBD-lipides à la membrane plasmique lorsqu'elles sont exprimées dans les levures délétées pour Drs2p, Dnf1p et Dnf2p (Lopez-Marques et al., 2010; Poulsen et al., 2008a; Xu et al., 2009).

La sur-expression d'Atp8b1 de souris dans les cellules CHOK1, déficientes en transport de PS à la membrane plasmique, permet de restaurer le transport de PS à la membrane plasmique, et dans les cellules du canalicule biliaire, une altération d'Atp8b1 entraîne une rupture de l'asymétrie de la membrane (Paulusma et al., 2008; Paulusma and Oude Elferink, 2005; Ujhazy et al., 2001). Atp8b3, quant à elle, est nécessaire à l'asymétrie de la PS des spermatozoïdes de la souris (Wang et al., 2004). La protéine Atp8a1 de la souris, dans des vésicules de sécrétions purifiées, présente une activité ATPasique stimulée par l'ajout de PS, et transporte de la NBD-PS (Soupene et al., 2008). Chez *C. elegans*, l'absence de l'ATPase P4 TAT-1, entraîne une exposition de la PS sur le feuillet externe des cellules germinatrices (Darland-Ransom et al., 2008).

Plus récemment, et plus directement, des études ont montré que les protéines Drs2p et ATP8A2 purifiées et reconstituées étaient capables de transporter des NBD-lipides (Coleman et al., 2009; Coleman et al., 2012; Zhou and Graham, 2009). Dans ces études, les protéines CDC50 de ces ATPases P4 étaient probablement présentes. De ce fait, nous ne savons pas si les protéines CDC50 sont nécessaires au transport des lipides par les ATPases P4.

- Les ATPases P4 sont impliquées dans le trafic vésiculaire

De nombreuses études ont associé l'inactivation des ATPases P4 à l'altération du trafic vésiculaire. Par exemple, dans la levure, la délétion des protéines Dnf1p et Dnf2p entraîne une altération, aux basses températures, de la formation des vésicules d'endocytose à la membrane plasmique (Pomorski et al., 2003). La délétion de Drs2p, quant à elle, perturbe la formation des vésicules à clathrine au niveau du *trans*-Golgi (Chen et al., 1999; Gall et al., 2002; Hua et al., 2002). L'utilisation d'une version thermosensible de Neo1p a montré une implication de cette protéine dans l'endocytose médiée par récepteurs, dans le trafic des protéines vacuolaires et dans le transport rétrograde entre le Golgi et le RE (Hua and Graham, 2003; Wicky et al., 2004).

Chez *C. elegans*, TAT-1 est requise pour l'endocytose dans les ovocytes et les cellules intestinales (Darland-Ransom et al., 2008; Ruaud et al., 2009). Chez les plantes, la mutation d'ALA3 entraîne une altération de l'exocytose de vésicules contenant des polysaccharides et des enzymes devant être normalement sécrétées (Poulsen, 2008 #864}. Chez les mammifères, ATP8B1 est impliquée dans la localisation apicale de protéines (Verhulst et al., 2010), et la délétion d'atp8b5 entraîne une perturbation de l'organisation du Golgi et l'inhibition à basse température de la sécrétion des protéines (Xu et al., 2009).

L'interaction des ATPases P4 avec des effecteurs du trafic membranaire appuie les observations détaillées ci-dessus (Tanaka et al., 2010). En effet, une interaction génétique a été montrée entre Drs2p et la petite protéine G Arf1p (Chen et al., 1999). Arf1p existe sous deux formes, une forme liée au GDP et soluble, et une forme liée au GTP et associée à la membrane, et activée. Arf1p-GTP recrute des effecteurs tels que les protéines du manteau (COPI ou clathrine) (Donaldson and Jackson, 2000). De même, il a été montré une interaction génétique entre Drs2p et (a) la chaîne lourde de la clathrine, Chc1p (Chen et al., 1999), (b) l'échangeur de GDP/GTP des protéines Arf (GEF), Gea2p (Chantalat et al., 2004), et (c) une sous-unité de l'adaptateur de la clathrine AP-1 (Liu et al., 2008), présent au niveau des membranes du *trans*-Golgi et des endosomes et impliqué dans le transport bidirectionnel entre ces deux organelles. Une interaction génétique de Drs2p avec des protéines adaptatrices de la clathrine au niveau des membranes du *trans*-Golgi et en direction des endosomes tardif, Gga1p et Gga2p (Liu et al., 2008) (Sakane et al., 2006)), ainsi qu'avec la protéine activatrice de la fonction GTPase d'Arf1p (GAP), Gcs1p (Sakane et al., 2006), a aussi été identifiée.

De façon remarquable au vu des résultats qui seront rapportés dans cette thèse, une interaction physique a aussi été montrée entre Drs2p et AP-1, Gea2p et Sac1p, cette dernière protéine étant une phosphatase responsable de la déphosphorylation du PI(4)P (Liu et al., 2008) (Chantalat et al., 2004) (Puts et al., 2010). De plus, un site de fixation au PI(4)P a été identifié au niveau de l'extrémité C-terminale de Drs2p (Natarajan et al., 2009). Le PI(4)P a un rôle important dans le trafic vésiculaire puisqu'il permet le recrutement à la membrane et la régulation des protéines adaptatrices de la clathrine (AP1 et GGAs) (Wang et al., 2007; Wang et al., 2003). Les protéines AP-1 et GGA sont impliquées dans la formation de vésicules à clathrine, au niveau du TGN, avec des destinations différentes.

Au vu du nombre de protéines impliquées dans la formation des vésicules avec lesquelles Drs2p interagit, il est tentant de penser que Drs2p joue le rôle d'une plateforme de recrutement de ces protéines (Puts and Holthuis, 2009). Cette hypothèse est néanmoins desservie par le fait qu'AP-1, Gea2p et la clathrine sont capables d'interagir et de s'assembler à la membrane du *trans*-Golgi dans les levures $\Delta drs2$ (Chen et al., 1999). Une autre hypothèse est que le transport de lipides vers le feuillet cytosolique des membranes stimulerait la création de vésicules. Cette hypothèse est appuyée par différentes observations, le fait par exemple que dans les cellules K562, la formation de vésicules d'endocytose est stimulée par l'addition, sur le feuillet externe de la membrane plasmique, de PS et PE, rapidement internalisés vers le feuillet cytoplasmique des membranes plasmiques (Farge et al., 1999).

D'autres observations suggèrent une implication directe du transport de lipides dans la régulation du trafic membranaire et des phénomènes de bourgeonnement vésiculaire : l'addition de Mg^{2+} -ATP sur la face externe de vésicules géantes formées à partir de cellules érythrocytaires en configuration « inside-out » (pour lesquelles la flippase expose donc son site de fixation à l'ATP vers l'extérieur)

conduit à l'apparition de petits bourgeons à la surface de la vésicule (Ezanno et al., 2010), traduisant l'augmentation de la surface du feuillet externe et le transport unidirectionnel de lipides catalysé par la flippase des érythrocytes. De plus, dans un contexte de biophysique fondamentale avec des membranes modèles, il a été montré que l'augmentation de l'aire d'un feuillet par rapport à l'autre, due au transport de lipides, entraînait des déformations membranaires ((Devaux et al., 2008). Cependant, pour qu'une déformation de la membrane aboutisse à la formation d'une vésicule, il est nécessaire que l'activité de flippase soit localisée et que la déformation soit stabilisée. La stabilisation de la déformation pourrait être possible grâce à la présence de protéines contenant des domaines sensibles aux courbures des membranes comme les protéines à domaines BAR ou ENTH.

- Les ATPases P4 sont également impliquées dans de nombreuses pathologies

Il existe de nombreuses maladies dans lesquelles les ATPases P4 sont impliquées (Folmer et al., 2009), et la diversité et la sévérité des phénotypes associés à des dysfonctionnements des ATPases P4 souligne l'importance de ces protéines dans les différentes fonctions cellulaires.

Parmi ces maladies, la maladie de Byler a été particulièrement étudiée. Cette maladie est caractérisée par une cholestase intra hépatique dont la forme la plus sévère conduit à un dysfonctionnement hépatique léthal (FIC1). Une cholestase est caractérisée par un arrêt ou une diminution de l'écoulement de la bile hépatique, dommageable puisque la bile hépatique aide à la digestion et à l'absorption des lipides dans l'intestin grêle (les sels biliaires solubilisent PC et cholestérol). Cette maladie est due à des mutations de l'ATPase de type P4, ATP8B1 (Bull et al., 1998). Cette enzyme est co-localisée, dans des conditions physiologiques, avec le transporteur de sels biliaires, ABCB11, au niveau de la membrane apicale des hépatocytes du canalicule biliaire (Ujhazy et al., 2001). La maladie de Byler est aussi caractérisée par des symptômes indépendants d'un problème de sécrétion de la bile ; pancréatite, diarrhée et perte de l'audition. Ces symptômes sont apparemment dus à la mutation d'ATP8B1 localisée à la surface apicale des cellules du pancréas, des entérocytes et des cellules cochléaires. Des études sur les cellules cochléaires ont montré qu'ATP8B1 était importante pour l'expression des protéines de la membrane apicale ainsi que pour la formation des microvillosités, suggérant un rôle pour ATP8B1 dans l'organisation de la membrane apicale et le trafic vésiculaire qui pourrait aider à comprendre les symptômes intra ou extra hépatiques de la maladie de Byler (Verhulst et al., 2010).

L'inactivation d'autres ATPases P4 est liée à de nombreux désordres chez l'homme et la souris (Folmer et al., 2009) (Tableau 2, page suivante). L'inactivation de l'ATPase P4 humaine ATP8A2, exprimée fortement dans le cerveau, les testicules et la rétine, est liée à de sévères retards mentaux (Cacciagli et al., 2010). Atp8b3 et b5, exprimées uniquement dans les testicules, sont impliquées, chez la souris, dans la capacitation des spermatozoïdes (Wang et al., 2004; Xu et al., 2009). ATP8B4 a été associé à la maladie d'Alzheimer (Li et al., 2008). ATP10A, quant à elle, a été reliée au diabète de type 2, à l'obésité et à des maladies du foie non dues à l'alcool, chez l'homme et la souris (Dhar et al., 2000). ATP10D est lié à des problèmes du métabolisme lipidique chez les souris et les hommes, qui sont associés à des risques d'infarctus du myocarde (Flamant et al., 2003; Hicks et al., 2009). ATP11C semble être importante pour le développement des lymphocytes B et impliquée dans l'homéostasie du foie (Siggs et al., 2011a; Siggs et al., 2011b; Yabas et al., 2011).

Tableau 2. Localisation de certaines ATPase P4 chez l'Homme, et potentielles implications dans des pathologies.

ATPase P4	Pathologie	Localisation tissulaire	Références
ATP8A2	Retard mental	Enrichie dans le cerveau, les testicules et la rétine	(Cacciagli et al., 2010)
ATP8B1	Cholestases intrahépatiques ; pancréatite ; diarrhée ; perte de l'audition	Ubiquitaire; enrichie dans l'intestin grêle et le pancréas; faible dans le cerveau	(Bull et al., 1998; Klomp et al., 2004; Paulusma et al., 2006; Stapelbroek et al., 2009; Verhulst et al., 2010)
ATP8B2		Ubiquitaire; enrichie dans le cerveau, la vessie et l'utérus; absente des reins et des muscles squelettiques	(Harris and Arias, 2003)
ATP8B3	Capacitation des spermatozoïdes anormale	Testicules	(Wang et al., 2004)
ATP8B4	Alzheimer	Ubiquitaire	(Li et al., 2008)
ATP8B5	Capacitation des spermatozoïdes anormale	Testicules	(Xu et al., 2009)
ATP10A	Diabète de type 2, obésité	Ubiquitaire; enrichie dans le cerveau, les reins, le foie et le pancréas; absente de l'intestin grêle	(Dhar et al., 2000; Dhar et al., 2004; Dhar et al., 2006)
ATP10D	Obésité, infarctus du myocarde	Ubiquitaire;	(Flamant et al., 2003)
ATP11C	Réponse immunitaire insuffisante, cholestase	Ubiquitaire; enrichie dans le foie, les reins et le pancréas; faible dans le cerveau et les muscles squelettiques	(Siggs et al., 2011a; Siggs et al., 2011b; Yabas et al., 2011)

c) Régulation des ATPases P4

L'activité des ATPases P4 semble être régulée spatialement, et ce, probablement, pour limiter l'initiation de processus non désirés et peut-être une consommation d'ATP inutile.

Par exemple, Drs2p est activée par le PI(4)P, qui n'est présent quasiment qu'au niveau des membranes du *trans*-Golgi, lieu où l'on retrouve Drs2p (Natarajan et al., 2009). L'apparition et la disparition des phosphoinositides dans les membranes cellulaires est un phénomène très strictement régulé, spatialement et temporellement, par la présence de kinases et de phosphatases spécifiques d'un substrat et localisées à des endroits précis. C'est pour cette raison que les organelles ont leur(s) phosphoinositide(s) spécifique(s) : PI(4,5)P₂ pour la membrane plasmique ; PI(3)P et PI(3,5)P₂ pour les endosomes ; PI(4)P pour l'appareil de Golgi. De nombreuses protéines interagissent avec les phosphoinositides par l'intermédiaire de domaines spécifiques, mais ces interactions sont faibles et nécessitent souvent une stabilisation par l'intermédiaire d'autres sites de fixation (co-récepteurs) (D'Angelo et al., 2008; Vicinanza et al., 2008). Outre le PI(4)P, Drs2p est régulée par Gea2p, impliquée dans la formation de vésicules à clathrine (Natarajan et al., 2009). Les sites de fixation du PI(4)P et de Gea2p sont situés sur l'extrémité C-terminale de Drs2p, et se chevauchent. Par homologie avec d'autres ATPases de type P (P3 et P2), il est tentant de penser qu'un domaine d'auto-inhibition est présent à l'une ou l'autre des extrémités de Drs2p.

Un site de phosphorylation par la kinase Fpk1p « RXSLD » (Roelants et al., 2010) a été identifié sur l'extrémité C-terminale de Dnf1p et Dnf2p (un site voisin est présent sur Drs2p). Cette phosphorylation régule l'activité de Dnf1p et Dnf2p. Le mécanisme de régulation de l'activité de Dnf1p et 2p par ces kinases n'est pas connu mais il a cependant été découvert que l'activité de Fpk1p était contrôlée par la composition en sphingolipides de la membrane (Roelants et al., 2010). En effet il se trouve que Fpk1p est régulée par l'activité inhibitrice de la kinase Ypk1p, elle-même régulée et activée par la kinase Pkh1p (Liu et al., 2005). Or, la présence de sphingolipides à longue chaîne stimule Pkh1p. D'un autre côté, Fpk1p est stimulée par les glycosphingolipides par un mécanisme inconnu (Roelants et al., 2010). Ainsi, l'activité de Dnf1p et Dnf2p semble être contrôlée par la composition en sphingolipides et glycosphingolipides de la membrane.

Un lien avec le métabolisme des stérols a aussi été identifié (Fig. 10). La protéine Kes1p (ou Osh4), une protéine fixant un stérol, inhibe l'activité de Drs2p (Muthusamy et al., 2009). Une étude récente a de plus suggéré que Osh4p prélève un stérol au niveau du RE et le transporte jusqu'aux membranes du *trans*-Golgi. À ce moment là, Osh4p prendrait en charge un PI(4)P, à la place du stérol, et le transporterait jusqu'au RE où il pourrait reprendre en charge un stérol (de Saint-Jean et al., 2011). Au niveau du RE, le PI(4)P pourrait alors être déphosphorylé par Sac1p et former du PI. En parallèle, Sec14p prendrait en charge un PI au niveau du RE et le transporterait au *trans*-Golgi où il pourrait être phosphorylé en PI(4)P par Pik1p. Sec14p prendrait alors en charge une PC au niveau du *trans*-Golgi pour la transporter au RE. Ainsi, Pik1p, en phosphorylant le PI en PI(4)P, permettrait le transfert et l'enrichissement en stérols de la membrane plasmique et du TGN.

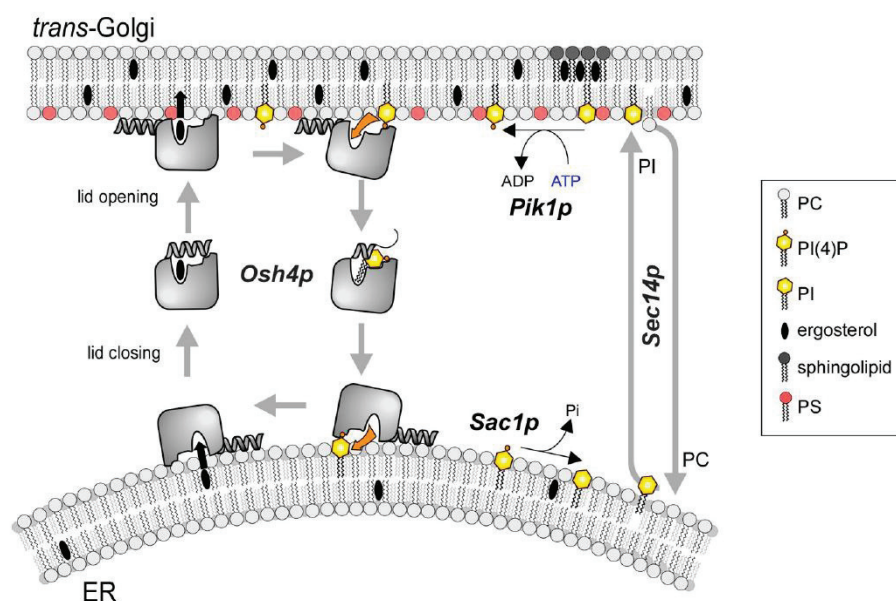


Figure 10. Modèle du couplage de l'échange stérol/PI(4)P par Osh4p (de Saint-Jean et al., 2011).

Osh4p solubilise efficacement les stérols dans les membranes neutres et faiblement compactées (RE). Le stérol est bloqué dans Osh4p par une sorte de couvercle. L'interaction d'Osh4p avec une membrane anionique provoque l'ouverture du couvercle et le relargage du stérol. Le PI(4)P augmente le relargage de stérol et, à son tour, est pris en charge par Osh4p. Osh4p transporte donc du PI(4)P du trans-Golgi vers le RE où un nouveau transport de stérol peut commencer. Bien que chaque étape soit réversible, la présence de la kinase Pik1p au niveau du trans-Golgi et de la phosphatase Sac1p au niveau du RE appuie l'hypothèse d'un transport directionnel. L'échange de stérol contre le PI(4)P par Osh4p est couplé à l'échange de PC contre le PI par Sec14p représenté sur la droite de la Figure.

I.4 Problématique et objectifs de la thèse

En résumé, il existe de nombreuses questions à résoudre afin de comprendre le mécanisme de transport des lipides par les ATPases P4. Si on considère que les ATPases P4 ont un cycle de transport et un mécanisme similaires aux autres ATPases de type P, alors il se pose le problème dit du « substrat géant » (Puts and Holthuis, 2009). En effet, les ATPases de type P sont connues pour transporter des ions et pour posséder un site de fixation situé au cœur de leur domaine transmembranaire. La résolution de la structure de certaines ATPases a permis d'identifier ce site de fixation. Un transport de phospholipides par les mêmes voies que le transport des ions serait problématique, puisque non seulement un lipide a une taille beaucoup plus importante qu'un ion, mais aussi puisque le site de transport des lipides devrait préserver la spécificité pour ces molécules amphiphiles (ce transport est spécifique de la tête polaire et du type de liaison avec les chaînes hydrocarbonées, les ATPases P4 ne transportant que des phospholipides, pas les sphingolipides).

Des études récentes ont suggéré deux modèles différents pour le transport des lipides par les ATPases P4 :

- Le premier modèle est basé sur la structure de l'ATPase- H^+ . En effet, la structure de l'ATPase- H^+ a mis en avant la présence d'une cavité au cœur du domaine transmembranaire, assez grande pour pouvoir contenir une tête polaire de lipide (Pedersen et al., 2007). En accord avec ce modèle,

une étude a montré l'importance d'une lysine, dans le segment transmembranaire M5 d'ATP8A2, pour le transport de la PS par ATP8A2 (Coleman et al., 2012) ; les auteurs de cette étude ont suggéré que cette lysine pourrait peut-être se lier au groupement phosphate des phospholipides. Ce modèle suggère un chemin, pour la tête polaire du lipide, *au travers* du domaine transmembranaire de l'ATPase.

- Le second modèle est basé sur la découverte d'une tête polaire de phospholipides dans une cavité entre les segments transmembranaires M4 et M2 de SERCA1a sous la forme E2 (Obara et al., 2005). L'intérêt de ce modèle provient du fait que c'est le glycérol qui semble être sélectionné par ce site de fixation, ce qui serait en adéquation avec le fait que les phospholipides sont transportés et pas les sphingolipides. Une autre étude, de la protéine Dnf1p, a suggéré l'importance du résidu Y616 pour la sélection du substrat de transport (Bryde et al., 2010). Ce résidu est l'équivalent de l'un des résidus qui, chez SERCA, sont en contact avec le phospholipide évoqué ci-dessus. Ce modèle suggère, quant à lui, un chemin pour le transport des lipides *à la surface* du domaine transmembranaire de l'ATPase P4 (vers l'hélice transmembranaire M4). Il faut noter que d'autres sites de fixation de lipides ont été identifiés par cristallographie des rayons X chez SERCA1a (Picard et al., 2007) et chez l'ATPase Na/K (Cohen et al., 2005).

La réconciliation entre ces deux modèles devra attendre la détermination des structures cristallographiques.

Comme déjà indiqué plus haut les protéines CDC50 seraient peut-être impliquées dans le mécanisme de transport. En effet, il a été montré que Cdc50p interagissait dynamiquement avec Drs2p, avec une interaction préférentielle entre Cdc50p et la forme « E2-P » de Drs2p (Lenoir et al., 2009). Par analogie avec le cycle catalytique des ATPases de type P, le lipide serait pris en charge après la transition « E1-P/E2-P ». Ainsi, il est possible que les protéines CDC50 jouent un rôle dans la fixation du lipide ou dans son occlusion.

Un cycle catalytique a même été proposé (Fig. 11) où le phospholipide (sur le feuillet externe de la membrane) et la protéine CDC50 se fixeraient, dans un ordre encore inconnu, à la forme « E2-P » sensible à l'ADP, ce qui permettrait l'obtention de la forme « E2-P » insensible à l'ADP. La translocation du lipide pourrait alors avoir lieu. La déphosphorylation de la forme « E2-P » entraînerait alors la libération de la protéine CDC50. Finalement, les mouvements induits par la transition de l'ATPase de la forme « E2 » à « E1 » provoquerait la libération du lipide sur le feuillet interne de la membrane (Stone and Williamson, 2012). Le cycle proposé par ces auteurs (Fig. 11) est cependant parfaitement hérétique par rapport au modèle de « Post-Albers », puisqu'il représente les formes phosphorylées « E1-P » et « E2-P » toutes deux avec un « tilde », alors que ce symbole désigne traditionnellement uniquement les formes phosphorylées dites « à haute énergies » (i.e. E1-P dans le schéma traditionnel de Post-Albers, et pas E2-P).

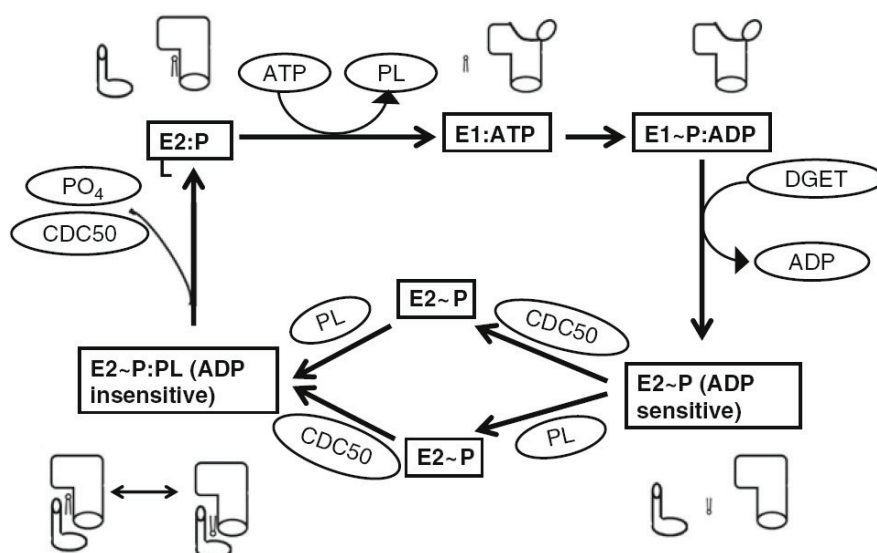


Figure 11. Cycle catalytique hypothétique des ATPases de type P4 ((Stone and Williamson, 2012)).

Les différentes conformations de l'enzyme sont représentées et schématisées. DGET correspond au motif TGES de l'ATPase- Ca^{2+} , qui est impliqué dans la conversion E2-P/E2. CDC50 et PL (phospholipide) interagissent avec la forme E2-P selon une séquence encore inconnue.

Les objectifs de cette thèse ont été, d'une part, de commencer à caractériser le cycle catalytique de l'ATPase P4 Drs2p et de tenter de préciser le rôle des protéines CDC50, apparemment indispensables à la fonction des ATPases P4. Outre cette caractérisation fonctionnelle, un autre objectif était de préparer l'étude structurale du complexe Drs2p/Cdc50p par cristallographie aux rayons X. L'obtention d'une structure nous permettrait de choisir l'un des deux modèles de transport évoqués plus haut, et permettrait aussi d'identifier ou de confirmer par mutagenèse dirigée les résidus importants pour l'activité et/ou le transport, et ce sur les deux sous-unités, ainsi que les zones d'interactions entre les deux sous-unités du complexe.

Afin de remplir ces objectifs, la première partie de ce travail a été de mettre au point la co-expression fonctionnelle et en grande quantité de Drs2p et de Cdc50p. Les protéines de la levure Drs2p et Cdc50p ont été choisies car Drs2p est l'ATPase P4 pour laquelle il existe, à ce jour, le plus de données impliquant une ATPase P4 dans le transport de lipides. En outre, les données obtenues pour Drs2p pourront être probablement utiles pour l'étude des autres ATPases P4. La quantité et la qualité des membranes obtenues nous a permis de débiter la caractérisation du cycle catalytique de Drs2p sans avoir besoin de la purifier. Afin de pouvoir dans l'avenir caractériser plus en détail ce cycle catalytique et déterminer la structure du complexe Drs2p/Cdc50p, il était nécessaire de purifier le complexe. La purification du complexe a donc été abordée dans la seconde partie de ce travail. Enfin, au cours de la mise au point de l'expression et de la purification du complexe Drs2p/Cdc50p, nous avons identifié la présence d'une version tronquée de Drs2p, qui ne semble pas posséder les mêmes propriétés fonctionnelle que la version non tronquée. La troisième partie de ce travail a donc consisté à amorcer l'étude du rôle de l'extrémité C-terminale de Drs2p.

II. Matériel et méthodes

II.1 Matériel

Les produits pour les cultures de levures et de bactéries proviennent de Difco (BD Bioscience). Les enzymes de restriction, de modification et les déglycosidases (PNGase F et Endoglycosidase H) proviennent de New England Biolabs. La polymérase haute fidélité (Phusion) provient de Finnzymes. Le kit de clonage Clone JET™ PCR et la sonde histidine (India Hisprobe™-HRP) proviennent de Thermo Fischer Scientific. Le DDM provient d'Anatrace, le C₁₂E₈ de Nikkol Chemical, le Triton X-100 de Pierce, le CHAPS de Serva, l'octylglucoside de Calbiochem, le Tween 20 de Bio-Rad, la digitonine de Sigma et l'Hecameg a été donné par H. Wroblewski et D. Plusquellec (CNRS, Rennes). Les lipides proviennent d'Avanti Polar Lipids. Le [γ -³²P]ATP (10 mCi/mL) radioactif provient de PerkinElmer. Les filtres en fibre de verre (A/E) proviennent de Pall Corporation. Les produits chimiques proviennent en général de Sigma. Les cocktails d'inhibiteurs de protéases (sans EDTA) proviennent de Roche Diagnostics ou de Sigma. La BSA (albumin fraction V) provient de Roth Sochiel. Le marqueur de poids moléculaire Precision Plus Protein Standards provient de Bio-Rad. Les anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre la protéine du *trans*-Golgi, Tlg2p, et contre la protéine de la vacuole, Vam3p, nous ont été donnés par le Dr. J. Holthuis (Holthuis et al., 1998). Les anticorps monoclonaux de souris dirigés contre la protéine du réticulum endoplasmique, Dpm1p, proviennent de Molecular Probes, et ceux dirigés contre la protéine de la membrane plasmique, Pma1p, proviennent d'Abcam (40B7, Cambridge, UK). L'anticorps de cochon d'Inde 79B, dirigé contre Serca1a, a été donné par le Dr. A.M. Lompré (INSERM, Paris). L'anticorps polyclonal de lapin, dirigé contre la boucle comprise entre les segments transmembranaires 4 et 5 de Drs2p, a été donné par le Dr. T. Graham (Vanderbilt University, USA). Les anticorps secondaires couplés à la peroxydase proviennent de Bio-Rad. Les membranes de réticulum sarcoplasmique (Picard et al., 2006a) de lapin et les levures exprimant Serca1a-Bad ont été préparées comme décrit précédemment (Jidenko et al., 2006). Les blots ont été révélés par chimiluminescence avec le Kit ECL de GE Healthcare. La résine Ni²⁺-NTA provient de Qiagen et la résine streptavidine de GE Healthcare (Streptavidin Sepharose High Performance). La thrombine provient de chez Calbiochem (thrombin, bovine high activity).

II.2 Stratégies de clonage

a) *Description du vecteur*

Le vecteur pYeDP60 utilisé dans notre laboratoire a été fourni par le Dr Denis Pompon (LISBP, Toulouse, (Pompon et al., 1996)). Il s'agit d'un vecteur navette pouvant se répliquer dans la bactérie (*E. coli*) et dans la levure (*S. cerevisiae*) grâce à la présence d'origines de réplication appropriées pour ces deux organismes. En plus de l'origine de réplication bactérienne (Ori), ce vecteur possède un gène de résistance à l'ampicilline (Amp^R) permettant la sélection des bactéries transformées par ce vecteur (Fig. 1). L'origine de réplication autonome de levure nommée 2 μ permet de maintenir plusieurs copies du vecteur au sein des levures (entre 5 et 20 copies par levure). Ce vecteur possède aussi les gènes *URA3* et *ADE2* qui vont pallier l'auxotrophie des levures à l'adénine et à l'uracile (voir description de la souche) et permettre ainsi la sélection des levures transformées par le vecteur. Le gène *ADE2*, impliqué dans la voie de biosynthèse de l'adénine, possède un autre intérêt, celui de rendre possible la croissance cellulaire à haute densité. En effet, même les milieux « riches » sont

très rapidement carencés en adénine : cette carence va permettre la sélection des levures transformées par le vecteur pendant l'expression en milieu riche.

Les gènes codant *DRS2*, *DRS2*^{D560N} et *CDC50* sont sous le contrôle d'un promoteur fort hybride *GAL10/CYC1* inductible par le galactose et contenant la séquence transactivatrice du promoteur *GAL1-GAL10* ainsi que la séquence d'initiation de la transcription du cytochrome c1, *CYC1*. Le vecteur possède aussi la séquence du terminateur de la phosphoglycérate kinase (*terPGK*) ainsi qu'une séquence codant pour l'étiquette Bad (domaine accepteur de biotine) (Fig. 1).

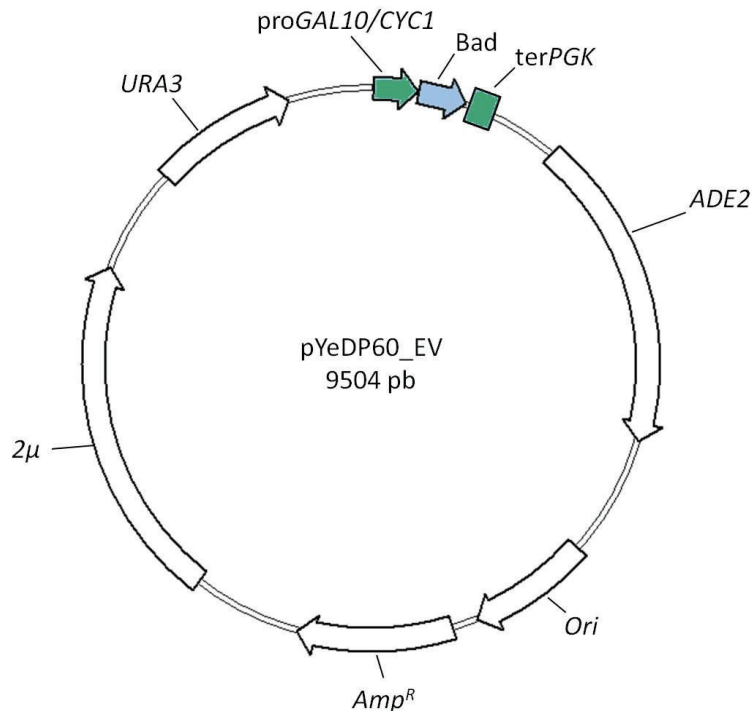


Figure 1. Vecteur navette pYeDP60_EV.

Le vecteur *pYeDP60_EV* contient les séquences d'un promoteur hybride inductible par le galactose, *GAL10/CYC1* et du terminateur de la PGK (*terPGK*) (vert). *ADE2* : marqueur de sélection pour pallier l'auxotrophie à l'adénine des levures *W303.1b/GAL4*. *URA3* : marqueur de sélection pour pallier l'auxotrophie à l'uracile des levures *W303.1b/GAL4*. *Amp^R* : gène de résistance à l'ampiciline. *Ori* : origine de réplication bactérienne. *2μ* : origine de réplication de levure. *Bad* : domaine accepteur de biotine (bleu). *EV* : empty vector.

*b) Construction des vecteurs de simple expression portant les gènes *DRS2*, *DRS2*^{D560N} ou *CDC50* (réalisée avant mon arrivée au laboratoire)*

Pour le clonage, toutes les PCR ont été réalisées avec la polymérase « Phusion ».

DRS2 a été isolé à partir du vecteur *pRS426-DRS2* (Lenoir et al., 2009) grâce aux enzymes de restriction *EcoRI* et *SmaI*. Il a été ajouté, en 3' ou 5' de la séquence codant *DRS2*, la séquence codant le domaine accepteur de biotine (*Bad*), et entre *DRS2* et *Bad*, un site de coupure par la thrombine. Autour de ce site de coupure, des glycines ont été ajoutées : 2 glycines entre le domaine *Bad* et le site de coupure par la thrombine, et 4 glycines entre le site de coupure par la thrombine et *DRS2*. *DRS2* et son étiquette ont alors été clonés dans *pYeDP60* sous contrôle du promoteur inductible

proGAL10/CYC1 et en amont de la séquence du terminateur *PGK*, ce qui a abouti soit à pYeDP60_*DRS2*-Bad soit à pYeDP60_Bad-*DRS2*, suivant la position de l'étiquette Bad (Fig. 2).

CDC50 a été amplifié par PCR en utilisant l'ADN génomique de la levure comme matrice. À la séquence codante on a ajouté soit une étiquette de 10 histidines, soit le domaine Bad en 3', soit encore le domaine Bad en 5'. Un site de coupure par la thrombine séparé par 2 glycines de l'étiquette et par 4 glycines de *CDC50* a également été ajouté (Fig. 2). *CDC50* et son étiquette ont alors été clonés dans pYeDP60 sous le contrôle du promoteur inducible proGAL10/CYC1 et en amont de la séquence du terminateur *PGK* dans pYeDP60, aboutissant à pYeDP60_*CDC50*-His₁₀, pYeDP60_*CDC50*-Bad ou pYeDP60_Bad-*CDC50*.

La mutation D560N a été introduite dans le gène codant *DRS2* par PCR en utilisant la méthode dite du « megaprimer » (Chen et al., 1999).

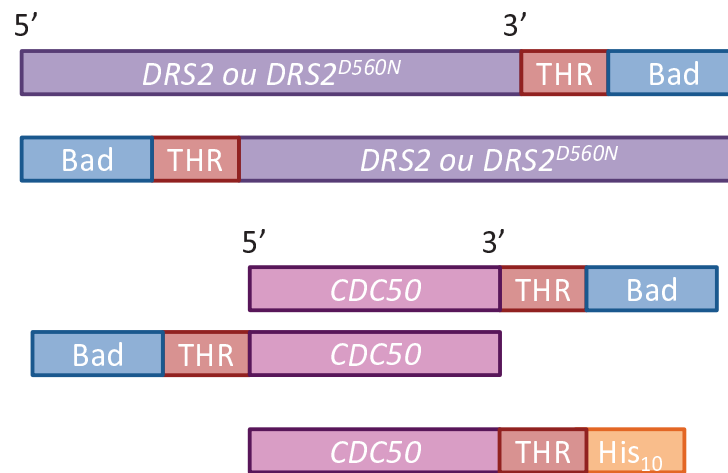


Figure 2. Différentes constructions de *DRS2* et *CDC50*.

Représentation des séquences codant *DRS2*, *DRS2*^{D560N} et *CDC50* ainsi que de leurs étiquettes (Bad ou His₁₀). THR : site de coupure par la thrombine. Bad : domaine accepteur de biotine.

c) Construction des vecteurs de co-expression, portant les gènes *DRS2* ou *DRS2*^{D560N} avec le gène *CDC50*

- Avec un site de coupure par la thrombine (réalisée avant mon arrivée au laboratoire)

Pour la génération des vecteurs de co-expression pYeDP60_*DRS2*-Bad/*CDC50*-His₁₀ et pYeDP60_*DRS2*^{D560N}-Bad/*CDC50*-His₁₀, un fragment de 2376 paires de bases comprenant la séquence proGAL10/CYC1-*CDC50*-His₁₀-ter*PGK* a été amplifié par PCR en utilisant pYeDP60_*CDC50*-His₁₀ comme matrice et avec deux amorces contenant toutes deux le site de restriction *Sbf*I (souligné). La séquence de l'amorce sens était (5') CAC ACC TGC AGG TGC ATG TAT ACT AAA CTC ACA A (3') et celle de l'amorce antisens (5') CAC ACC TGC AGG AGC TAT GAC CAT GAT TAC GC (3'). Ces deux amorces s'hybrident en amont du promoteur *GAL10/CYC1* et en aval du terminateur de la *PGK*. Ce fragment de PCR a ensuite été cloné dans le vecteur pJET1.2/blunt en utilisant le kit de clonage CloneJET™, selon les recommandations du fournisseur. Le vecteur résultant (qui contient la cassette proGAL10/CYC1-*CDC50*-His₁₀-ter*PGK*) ainsi que les vecteurs pYeDP60_*DRS2*-Bad et pYeDP60_*DRS2*^{D560N}-Bad ont été digérés par *Sbf*I, et le produit de la digestion a été purifié sur gel d'agarose. pYeDP60_*DRS2*-Bad et pYeDP60_*DRS2*^{D560N}-Bad ont alors été déphosphorylés par la

phosphatase alcaline d'intestin de veau et purifiés sur gel, pour être par la suite ligués par l'ADN ligase T4 avec la cassette proGAL10/CYC1-CDC50-His₁₀-terPGK.

- Avec un site de coupure par la TEV

Le remplacement du site de coupure par la thrombine par le site de coupure par la TEV a été réalisé par PCR de fusion.

Dans un premier temps, un fragment de 395 pb («TEV-Bad ») a été amplifié par PCR à partir de la matrice pYeDP60_SERCA1a-Bad(TEV), qui possède le site de coupure par la TEV et qui nous a été gentiment donné par Christine Jaxel (Fig. 3). L'amorce sens (5' *TTT CAT TTG ATA TAG GTG GTG CGG CCG CGG AGA ATC TTT ATT TT* 3') comprend une séquence s'hybridant à l'extrémité 3' de *DRS2* (en italique), une séquence codant deux glycines (en gras) suivie du site de restriction *NotI*, et une séquence s'hybridant à l'extrémité 5' du site de coupure par la TEV (souligné). L'amorce anti-sens (5' CCA AAG AAG CAC CAC CAC C 3') comprend une séquence s'hybridant avec l'extrémité 5' de la séquence du terminateur *PGK* (Fig. 3).

Dans un second temps, un fragment de 1346 pb (« *DRS2* 3' ») a été amplifié par PCR à partir de la matrice pYeDP60_*DRS2*-Bad(THR). L'amorce sens (5' TGG CGA AGC TTT GTA AAG CG 3') comprend une séquence s'hybridant à *DRS2* dans une région située 97 paires de bases en amont du site de restriction unique *NheI* (2846), soit la séquence allant des bases 2749 à 2768 de *DRS2*. L'amorce anti-sens (5' CCG CGG CCG **CAC CAC CTA TAT CAA ATG AAA TAT** 3') comprend le site de restriction *NotI* suivi de deux glycines (gras) et une séquence s'hybridant à l'extrémité 3' de *DRS2* (en italique) (Fig. 3).

Les produits de PCR «TEV-Bad » et « *DRS2* 3' » ont ensuite été fusionnés pour former « *DRS2*-TEV-Bad » en utilisant comme amorce sens celle utilisée pour l'obtention de « *DRS2* 3' », (5' TGG CGA AGC TTT GTA AAG CG 3'), qui s'hybride sur les bases 2749 à 2768 de *DRS2*. L'amorce anti-sens est celle utilisée pour l'obtention de «TEV-Bad », (5' CCA AAG AAG CAC CAC CAC C 3'), qui comprend une séquence s'hybridant avec l'extrémité 5' de la séquence du terminateur *PGK*. « *DRS2*-TEV-Bad » de même que les vecteurs pYeDP60_*DRS2*-Bad(THR) et pYeDP60_*DRS2*^{D560N}-Bad(THR) ont été digérés par *NheI* et *SacI*. La partie du gène *DRS2* (entre les sites de restrictions *NheI* et *SacI*) initialement présente dans pYeDP60_*DRS2*-Bad(THR) peut alors être remplacée, par ligation, par le fragment contenant le site de coupure par la TEV. Le produit de la ligation va servir à transformer des bactéries *E. coli* JM109 compétentes. On obtient ainsi pYeDP60_*DRS2*-Bad(TEV) et pYeDP60_*DRS2*^{D560N}-Bad(TEV).

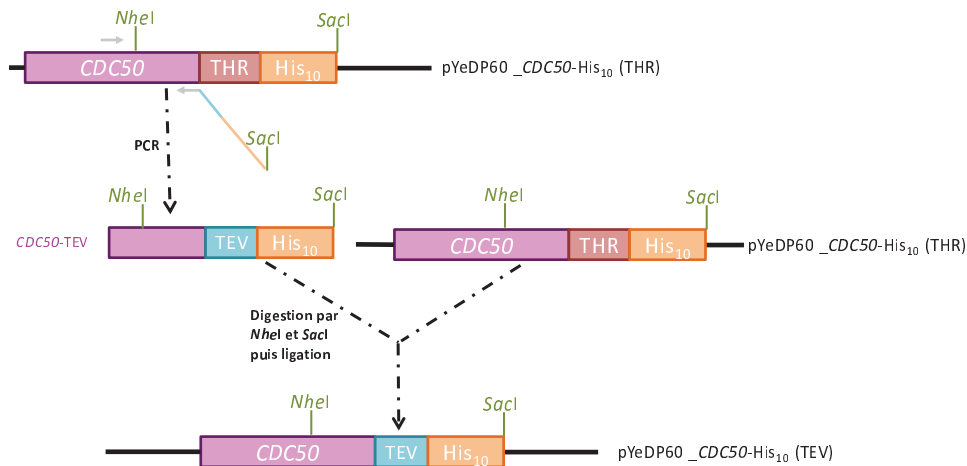


Figure 4. Clonage de *CDC50*-His₁₀(TEV) dans le vecteur pYeDP60.

Les flèches grises horizontales représentent les amorces utilisées. Les enzymes de restriction utilisées au cours du clonage sont indiquées. TEV : séquence du site de coupure par la protéase TEV. THR : séquence du site de coupure par la thrombine. His₁₀ : étiquette de 10 histidines.

Les vecteurs de co-expression pYeDP60_DRS2-Bad/*CDC50*-His₁₀(TEV) et pYeDP60_DRS2^{D560N}-Bad/*CDC50*-His₁₀(TEV) ont ensuite été obtenus selon la même stratégie que celle utilisée pour obtenir les vecteurs de co-expression possédant le site de coupure par la thrombine.

d) Construction des délétions N- et C-terminales de DRS2

Un fragment de 2332 pb (« *DRS2*ΔNter ») a été amplifié par PCR à partir de la matrice pYeDP60_DRS2-Bad(TEV). L'amorce sens (5' CAC AGA ATT CGA CAT GTC CTT CGG TTA TAG TGA CAA C 3') comprend le site de restriction *EcoRI* (souligné) suivi de la séquence Kozak (GAC), du codon d'initiation (en gras et souligné) et de la séquence s'hybridant à *DRS2*, à partir des bases qui codent l'acide aminé 195. L'amorce anti-sens (5' CAC AAG CTG CCT GTA TCA TAC TAA C 3') comprend une séquence s'hybridant à *DRS2* dans une région (codant la séquence 2874 à 2895) située 28 paires de bases en aval du site de restriction unique *NheI* (2846).

Un fragment de 948 pb (« *DRS2*ΔCterY1226 ») a été amplifié par PCR à partir de la matrice pYeDP60_DRS2-Bad(TEV). L'amorce sens (5' TGG CGA AGC TTT GTA AAG CG 3') s'hybride à la séquence allant des bases 2749 à 2769 de *DRS2*, en amont du site unique *NheI*. L'amorce anti-sens (5' CAC AGC GGC CGC **ACC ACC** ATA GTA CTT CCA TAG AAA ATC TC 3') comprend le site de restriction *NotI* (souligné) suivi de deux glycines (en gras) et d'une séquence s'hybridant à l'extrémité 3' de *DRS2* (en italique).

De la même manière les produits de PCR suivant ont été obtenus : « *DRS2*ΔCter1249 », « *DRS2*ΔCter1274 », « *DRS2*ΔCter1283 » et « *DRS2*ΔCter1302 ». Les amorces sens et anti-sens utilisées sont regroupées dans le Tableau 1.

Tableau 1. Amorces utilisées pour les délétions C-terminales.

PCR	Amorce Sens	Amorce antisens
<i>DRS2</i> ΔCterY1226 (séquence 2749 à 3697)	(5') <i>TGG CGA AGC TTT GTA AAG</i> CG (3')	(5') CAC <u>AGC GGC CGC</u> ACC ACC ATA <i>GTA CTT CCA TAG AAA ATC</i> TC (3')
<i>DRS2</i> ΔCterS1249 (séquence 2749 à 3767)	(5') <i>TGG CGA AGC TTT GTA AAG</i> CG (3')	(5') CAC <u>AGC GGC CGC</u> ACC ACC AGA <i>GTC GCT GAT ATT GTA TTT</i> C (3')
<i>DRS2</i> ΔCterG1274 (séquence 2749 à 3839)	(5') <i>TGG CGA AGC TTT GTA AAG</i> CG (3')	(5') CAC <u>AGC GGC CGC</u> ACC ACC <i>TCT TTG TTT TTT CAT TCT TTG</i> CA (3')
<i>DRS2</i> ΔCterG1283 (séquence 2749 à 3867)	(5') <i>TGG CGA AGC TTT GTA AAG</i> CG (3')	(5') CAC <u>AGC GGC CGC</u> ACC ACC <i>ACC CTC TTC AGC CTG TGA AA</i> (3')
<i>DRS2</i> ΔCterG1302 (séquence 2749 à 3944)	(5') <i>TGG CGA AGC TTT GTA AAG</i> CG (3')	(5') CAC <u>AGC GGC CGC</u> ACC ACC <i>ACC GTA CTT ACC TCT CTT TTG</i> (3')

Amorce sens : s'hybride à la séquence 2749 à 2769 de DRS2. Amorce anti-sens : la partie soulignée correspond au site de restriction NotI, la partie en gras code les deux glycines et la partie en italique correspond à la séquence qui s'hybride à l'extrémité 3' de DRS2, variable selon la délétion souhaitée.

Les produits de PCRs obtenus sont introduits dans le vecteur pJET1.2/blunt en utilisant le kit de clonage CloneJET™ selon les recommandations du fournisseur. Les vecteurs résultants ainsi que le vecteur pYeDP60_*DRS2*-Bad(TEV) ont alors été digérés par *NotI* et *NheI* pour les délétions C-terminales ou par *EcoRI* et *NheI* pour la délétion N-terminale. Les fragments d'ADN d'intérêt ont été isolés. La partie du gène *DRS2* (fragment *NheI*/ *NotI* ou *EcoRI*/*NotI*) initialement présente dans pYeDP60_*DRS2*-Bad(TEV) peut alors être remplacée, par ligation, par le fragment tronqué. Le produit de ligation va servir à transformer des bactéries *E. Coli* JM109 compétentes. On obtient ainsi pYeDP60_*DRS2*ΔNter-Bad(TEV), pYeDP60_*DRS2*ΔCterY1226-Bad(TEV), pYeDP60_*DRS2*ΔCterS1249-Bad(TEV), pYeDP60_*DRS2*ΔCterG1274-Bad(TEV), pYeDP60_*DRS2*ΔCterG1283-Bad(TEV) et pYeDP60_*DRS2*ΔCterG1302-Bad(TEV). Les vecteurs de co-expression sont obtenus selon la même stratégie que précédemment.

Toutes les constructions présentées dans la partie II.2 ont été vérifiées par séquençage.

II.3 Méthodes de biologie moléculaire

Tous les ADN sont conservés à -20°C. Les milieux sont décrits en Annexe 3.

a) PCR

- *PCR classique*

Avec l'ADN polymérase Phusion, les PCR sont réalisées comme suit : 0,2-1 ng de matrice ADN, 0,5 μM de chacune des amorces, 200 μM de mélange équimolaire de dNTPs, 10 μL de tampon 5X fourni

avec l'enzyme, et de l'eau distillée et filtrée de façon à obtenir un volume total de 50 µL. On ajoute 1 unité de la Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase.

Avec l'ADN polymérase *Taq*, les PCR sont réalisées comme suit : 0,2-1 ng de la matrice d'ADN (*HIS3loxP* ou d'ADN génomique), le tampon ThermoPol II (Mg-free) 1X final, 2 mM de MgSO₄, 0,5 µM de chacune des amorces, 200 µM de mélange équimolaire de dNTPs, et de l'eau distillée de façon à obtenir un volume final de 50 µL. On ajoute 2,5 unités de l'ADN polymérase *Taq*.

Le programme utilisé pour les PCR est résumé dans le Tableau 2.

Tableau 2. Programme des PCR

Étape	Température	Temps	Nombre de cycle
Dénaturation initiale	95°C	3 minutes	1
Dénaturation	95°C	30 secondes	30
Hybridation	55°C	1 minute	
Élongation	72°C	1 minute/kb pour la <i>Taq</i> ; 30 secondes/kb pour la Phusion	
Élongation finale	72°C	5 minutes	1

- *PCR de fusion*

Le but d'une PCR de fusion est de joindre deux fragments d'ADN grâce à une partie de leur séquence qui est commune. Pour réaliser cette PCR de fusion, il faut tout d'abord identifier le fragment le plus long et déterminer, d'après la quantification du produit de PCR obtenu, le volume nécessaire pour avoir 1.10¹⁰ copies de ce fragment (« *DRS2 3'* » dans notre cas). Le second fragment étant quatre fois plus petit (« *TEV-Bad* »), on en mettra quatre fois plus, soit 4.10¹⁰ copies. Pour optimiser les chances d'obtenir cette fusion, plusieurs températures d'hybridation ont été essayées (température de fusion (T_m) +/- 10°C). Le programme de ces PCR de fusion est présenté dans le Tableau 3.

Tableau 3. Programme des PCR de fusion.

Etape			PCR 1	PCR 2	PCR 3	PCR 4	PCR 5	PCR 6
FUSION	Mélange initial		Matrices + dNTPs + tampon + l'ADN polymérase <u>Phusion</u> dans les conditions classiques					
	A	Dénaturation	2 minutes à 98°C					
	B	Hybridation (2 minutes)	52,2°C	54,4°C	58,8°C	64,2°C	69,1°C	72°C
	C	Elongation	10 minutes à 72°C					
			Ajout des amorces dans les conditions classiques					
AMPLIFICATION	A	Dénaturation	1 minute à 98°C					
	B	Hybridation	52,2°C	54,4°C	58,8°C	64,2°C	69,1°C	72°C
	C	Elongation	2 minutes à 72°C					

La première étape, nommée « Fusion », consiste à fusionner les deux fragments d'ADN. Elle se déroule sans amorce : après dénaturation, la séquence commune aux deux fragments d'ADN va s'hybrider, l'ADN polymérase

pourra se fixer et le fragment fusionné sera utilisé comme matrice. Dans la seconde étape, nommée « Amplification », les amorces sont ajoutées et une PCR classique peut avoir lieu.

b) Nettoyage des produits de PCR et de digestion

Les produits de PCR et de digestion sont nettoyés sur une résine Sephadex G100, qui permet l'élimination des molécules de taille inférieure à 100 kDa, dont les amorces et certaines protéines. La résine G100 (4 g) est suspendue dans 100 mL de tampon TE' (10 mM Tris pH 8 ; 0,1 mM EDTA), lui-même filtré et autoclavé. 850 µL de cette résine resuspendue sont déposés dans la partie supérieure d'un tube Spin module (MP Biomedicals). On centrifuge pendant 3 minutes à 1000 g_{av} (rotor AM19, Jouan MR22) puis on dépose le produit de la PCR délicatement en haut de la résine. On centrifuge pendant 8 minutes à 1000 g_{av} (rotor AM19, Jouan MR22). Le filtrat est conservé.

c) Séparation, quantification et purification de l'ADN sur gel d'agarose

La qualité des produits de PCR et de digestion est vérifiée sur gel d'agarose (de concentration comprise entre 0,8% et 1,2% selon la taille des fragments d'ADN à séparer). Les migrations durent généralement 2 heures à 60V dans le tampon TAE (40 mM Tris-HCl pH 8,3 ; 20 mM acétate et 1 mM EDTA). Le gel est coloré avec 0,005% de BET (v/v) pendant 10 minutes, puis incubé pendant 10 minutes avec 1 mM de MgSO₄ pour éliminer l'excès de BET. Si nécessaire, le fragment d'ADN d'intérêt est découpé avec un scalpel sur une table à UV proche (dark reader, clarechemical) et purifié avec le kit « QIAquick Gel extraction » de Qiagen.

Les produits de PCR ou de digestion ont été quantifiés par comparaison avec une gamme de marqueurs de masses moléculaires.

d) Digestion de l'ADN par des enzymes de restriction

Les enzymes de restriction choisies sont utilisées à 10U/µg d'ADN dans un volume final de 30 µL selon les recommandations du fournisseur.

e) Déphosphorylation de l'ADN

La déphosphorylation est effectuée par la phosphatase alcaline de l'intestin de veau à raison de 0,5 unité/µg d'ADN. La réaction se déroule pendant 1 heure à 37°C.

f) Ligation des ADN

La ligation s'est faite grâce à l'ADN ligase du phage T4 et cela en utilisant 400 unités/20 µL de mélange de ligation. À chaque fois qu'il était possible, 50 ng de plasmide ont été utilisés pour la ligation. Le ratio insert/plasmide qui a été appliqué pour l'obtention des vecteurs de simple expression était de 3:1, et pour les vecteurs de co-expression, le ratio était de 10:1. La réaction de ligation a été conduite pendant 4 heures à 16°C ou toute la nuit à 4°C.

g) Préparation des bactéries E. coli compétentes (JM109)

Les bactéries sont rendues compétentes par la méthode du chlorure de calcium : des colonies de la bactérie JM109 sont inoculées dans 5 mL de milieu LB à 37°C et 200 rpm pendant une nuit (préculture). Le matin suivant, un Erlenmeyer contenant 100 mL de LB estensemencé avec 1 mL de cette préculture. Lorsque la densité optique (DO) à 600 nm atteint 0,3-0,5, les 100 mL de culture sont

centrifugés pendant 5 minutes à 2000 g_{av} et à 4°C (rotor JA-12, centrifugeuse Beckman Avanti J-20 XP). Le culot obtenu est ensuite lavé par 50 mL d'un tampon alcalin contenant du calcium (50 mM $CaCl_2$; 10 mM Tris pH 8) et placé 20 minutes dans la glace. Après centrifugation pendant 5 minutes à 2000 g_{av} et à 4°C, le culot est resuspendu avec 1,5 mL du même tampon et replacé dans la glace pendant 1 heure de plus. On ajoute alors du glycérol à la concentration finale de 20% (v/v) et les cellules sont aliquotées et conservées à -80°C après congélation rapide dans l'azote liquide.

h) Transformation des bactéries compétentes

Les produits de la ligation sont mélangés avec 100 μ L de bactéries compétentes, 7,5 μ L de tampon $CaCl_2$ (50 mM Tris pH 8 ; 500 mM $CaCl_2$) filtré et froid, et le volume est ajusté à 150 μ L avec de l'eau distillée filtrée. Ce mélange est incubé 30 minutes dans la glace puis précisément 1 minute à 42°C pour réaliser le choc thermique nécessaire à la transformation. 1 mL de milieu LB est ajouté et le tout est incubé à 37°C, 180 rpm pendant 1 heure, pour permettre l'expression du gène de résistance à l'ampicilline. Le mélange est centrifugé 5 minutes à 300 g_{av} (rotor F241.5P, Microfuge 22R Beckman) et 1 mL du surnageant est retiré. Le culot est resuspendu avec les 150 μ L de surnageant restant et étalé sur une boîte de LB additionnée d'ampicilline que l'on place à 37°C pour la nuit.

L'ADN plasmidique contenu dans les bactéries est récupéré grâce à l'utilisation du kit NucleoSpin® Plasmid /Plasmid (NoLid) de Macherey-Nagel. Toutes ces préparations d'ADN plasmidique sont vérifiées par digestion.

i) Préparation de l'ADN génomique de levure

Les levures sont mises en culture dans 10 mL de milieu SD pendant 24 heures, à 30°C et 200 rpm. La culture est centrifugée pendant 15 minutes à 2500 g_{av} et 4°C (rotor F35-6-30, centrifugeuse 5430, eppendorf). Le culot est resuspendu dans 500 μ L d'eau distillée filtrée et transféré dans un eppendorf de 1,5 mL. On centrifuge 1 minute à 14000 g_{av} (microfuge 22R Beckmann, rotor F241.5P). Le culot est ensuite repris par 200 μ L de tampon de lyse (2% Triton X-100 (p/v), 1% SDS (p/v), 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8; 1 mM EDTA). Des billes en verre de 0,5 mm de diamètre sont ajoutées ainsi que 200 μ L du mélange phénol/chloroforme/isoamylalcool (25/24/1), sous la hotte. Le broyage s'effectue pendant 10 minutes à température ambiante sur Vibrax (puissance 7). 200 μ L de tampon TE filtré (10 mM Tris pH 8 et 1 mM EDTA) sont ajoutés. Le broyat est centrifugé pendant 5 minutes à 14000 g_{av} (microfuge 22R Beckmann, rotor F241.5P). La phase aqueuse et translucide est transférée dans un nouvel eppendorf de 2 mL. 1 mL d'éthanol à 96% est alors ajouté et le tout est centrifugé pendant 5 minutes à 14000 g_{av} (microfuge 22R Beckmann, rotor F241.5P). Le culot est à nouveau centrifugé pendant 5 minutes puis mis à sécher sous la hotte. Le culot est finalement resuspendu avec 200 μ L de tampon TE filtré.

j) Test de croissance des levures à basse température

Afin d'effectuer ce test, chacune des souches transformées par le plasmide approprié et stockées à -80°C a été étalée sur boîte S6A, et incubée à 28°C pendant environ 3 jours. Quelques colonies de chaque souche ont été inoculées dans 5 mL de milieu liquide S6A et incubées toute la nuit à 28°C, sous une agitation de 180 rpm. L'absorbance à 600 nm a été mesurée pour chacune des cultures, qui ont ensuite été diluées dans le milieu inductif S5A de façon à atteindre une DO_{600nm} de 0,02, de 0,002

et de 0,0002. Ensuite, 5 µL de chaque dilution ont été déposés sur une boîte S5A. La croissance des levures incubées à 28°C et à 20°C a été suivie pendant une semaine.

k) Délétion des gènes *DRS2* et *CDC50* endogènes

La cassette « *HIS3loxP* » a été obtenue par PCR en utilisant le vecteur pFA6a-*HIS3MX6* (Wach et al., 1997) comme matrice. Les amorces sens et anti-sens comprennent la séquence *loxP*.

Le produit de la PCR, « *HIS3loxP* », sert ensuite de matrice à une seconde PCR avec des amorces s'hybridant à la séquence *loxP* et comportant une quarantaine de bases complémentaires aux régions 5' et 3' non traduites du gène à déléter (i.e. *DRS2* ou *CDC50*) (Fig. 5). Ces PCR ont été réalisées avec la polymérase *Taq*. Le gène *HIS3* permettra de pallier l'auxotrophie de la levure à l'histidine, et fournit donc un crible rapide pour l'identification des levures délétées.

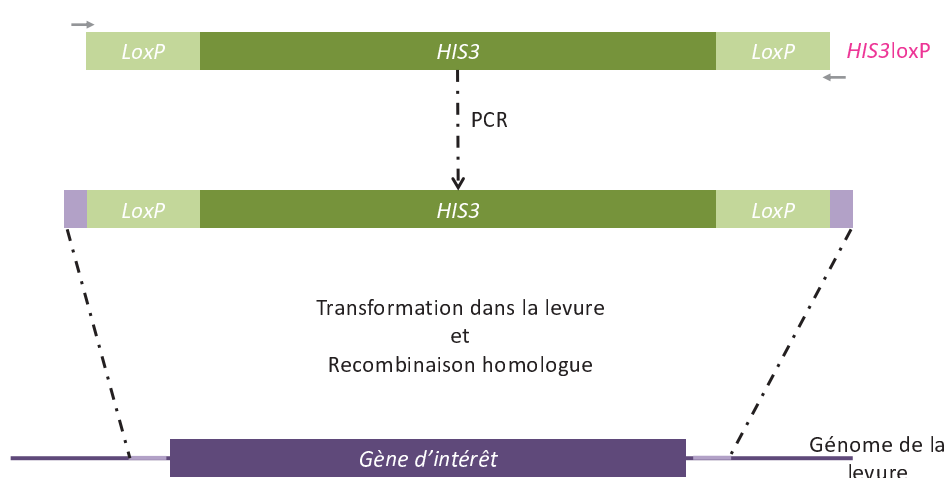


Figure 5. Schéma du système de délétion des gènes *DRS2* et *CDC50*.

Les flèches grises horizontales représentent les amorces utilisées pour la PCR réalisée à partir de la cassette *HIS3loxP*. Le produit de cette seconde PCR contient le gène *HIS3* en vert foncé, les séquences *LoxP* en vert clair et les séquences complémentaires des régions 5' et 3' non traduites du gène à déléter en mauve.

Les levures W303.1b/*GAL4* ont été mises en culture dans un milieu minimum SD pendant 24 heures, à 28°C et 180 rpm. La transformation se déroule comme décrit précédemment sauf que dans ce cas, 20 µL de produit de PCR ont été utilisés pour la transformation. Les levures transformées ont été sélectionnées sur un milieu SD sans Histidine. On obtient ainsi $\Delta drs2$ et $\Delta cdc50$.

L'efficacité de la délétion des gènes cibles est vérifiée par PCR en utilisant l'ADN génomique comme matrice et avec une amorce qui s'hybride soit dans le gène à déléter soit dans *HIS3*. Les amorces utilisées pour ces PCR sont listées en Annexe 3.

II.4 Expression de *Drs2p* et *Cdc50p*

a) Description de la souche de levure

La souche de levure W303.1b/*GAL4* (α , *leu2*, *his3*, *trp1 ::TRP1-GAL10-GAL4*, *ura3*, *ade2-1*, *can^r*, *cir⁺*) décrite précédemment (Lenoir et al., 2002), a été utilisée tout au long de cette étude. Pour obtenir cette souche, la souche W303.1b originelle a été modifiée afin d'ajouter au sein du génome de la levure, par recombinaison homologue, une copie supplémentaire du gène *GAL4* sous le

contrôle du promoteur *GAL10*. Le niveau d'expression de cette protéine dans la souche W303.1b originelle est très faible (1 à 2 copies par cellule), ce qui limite l'expression des protéines sous contrôle de ces séquences promotrices. De plus, l'activation de la transcription par la protéine Gal4p nécessite la présence de galactose dans le milieu afin de lever la répression exercée sur celle-ci par la protéine Gal80p (Fig.6). La surexpression de Gal4p issu de cette nouvelle construction sera donc dépendante de l'ajout de galactose (Fig. 6).

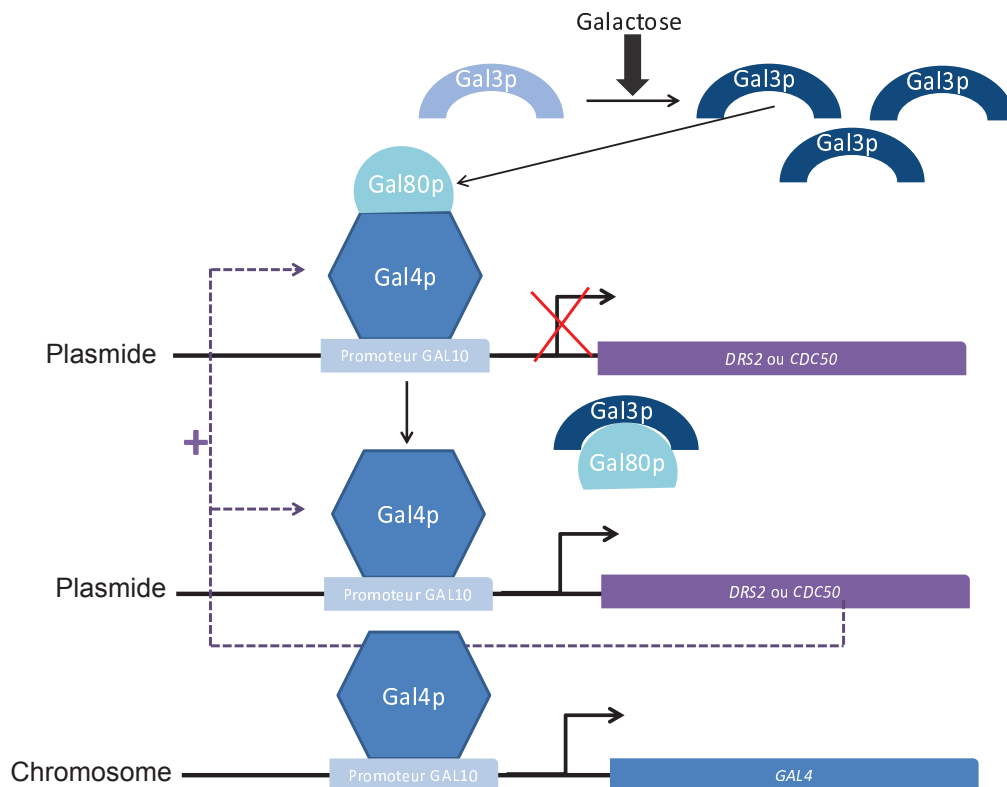


Figure 6. Schéma du système d'expression de Drs2p et Cdc50p.

La protéine Gal4p est un facteur de transcription qui interagit avec les séquences promotrices de type GAL. En absence de galactose, Gal4p est réprimée par la protéine Gal80p. La présence de galactose et l'absence de glucose va activer et induire l'expression de l'inducteur Gal3p qui va lever la répression de Gal80p en interagissant avec celui-ci. La transcription des gènes sous contrôle des séquences promotrices de type GAL a lieu, notamment de la copie de *GAL4* insérée dans le génome. Ceci permet l'augmentation du nombre de copies de Gal4p et, par conséquent, de toutes les protéines sous contrôle des séquences promotrices de type GAL.

Cette souche de levure est par ailleurs auxotrophe aux acides aminés leucine et histidine mais aussi pour les bases uracile et adénine. Ces éléments essentiels devront être apportés par le milieu de culture ou par complémentation. Cette propriété nous permettra de sélectionner les levures ayant été transformées par le vecteur pYeDP60.

b) Transformation des levures

La méthode est adaptée de (Gietz et al., 1995).

Des levures sont inoculées dans 4 mL du milieu S6AU (composition des milieux en Annexe 3) et incubées pendant 24 heures à 28°C. Elles sont ensuite centrifugées à 2000 g_{av} pendant 5 minutes (microfuge 22R Beckmann, rotor F241.5P). Le culot est resuspendu avec 50 μ L d'ADN de sperme de

saumon à 2 mg/mL, dénaturé préalablement pendant 5 minutes à 100°C et refroidi dans la glace avant utilisation. 3 µL d'ADN circulaire sont ajoutés. Le mélange est vortexé et on ajoute 500 µL de Tampon PLATE stérile (40% PEG (v/v) ; 0,1 M lithium acétate ; 0,01 M Tris-HCl pH 7,5 ; 1 mM EDTA) puis 20 µL de DTT 1 M filtré. Le mélange est vortexé, et laissé toute la nuit à température ambiante (sur la paillasse). Le lendemain, on centrifuge à 500 g_{av} pendant 2 minutes (microfuge 22R Beckmann, rotor F241.5P). Le culot est repris par 100 µL de milieu sélectif (S6A) et étalé sur une boîte de sélection (S6A) que l'on place à 28°C pendant 3 à 5 jours.

c) Préparation de fractions membranaires totales après croissance des levures en milieu minimum

Les levures transformées sont étalées sur une boîte S6A à partir d'un stock glycérol et incubées pendant 48 heures à 28°C. Les colonies obtenues sont ensemencées en milieu liquide S6A (5 mL) et incubées à 28°C et 180 rpm pendant 24 heures. Les levures sont ensuite diluées dans le milieu S5A, contenant du galactose, de façon à obtenir une absorbance à 600 nm d'environ 0,2. L'expression, après induction, a lieu pendant 17 heures à 28°C. À la fin de la phase d'expression, l'absorbance à 600 nm est aux alentours de 2, et 5 mL de culture sont centrifugés à 1000 g_{av} et 4°C pendant 10 minutes (centrifugeuse SIGMA 3-18K). Le culot est lavé avec 1 mL de tampon TEPI à 4°C (50 mM Tris-HCl pH 6,8 ; 5 mM EDTA ; 20 mM NaN₃, 1 mM PMSF et 1X du cocktail d'inhibiteurs de protéases SigmaFast), transféré dans un eppendorf de 1,5 mL, puis centrifugé à 1000 g_{av} et 4°C pendant 10 minutes (microfuge 22R Beckmann, rotor F241.5P). Le culot est resuspendu dans 100 µL de TEPI froid. On ajoute des billes de verre de 0,5 mm de diamètre et les cellules sont broyées sur Vibrax pendant 20 minutes à 4°C (à vitesse moyenne). Du tampon TEPI est ajouté afin d'obtenir un volume final de 1 mL. Le mélange est centrifugé à 500 g_{av} (microfuge 22R Beckmann, rotor F241.5P) à 4°C pendant 5 minutes pour se débarrasser des billes et des cellules non broyées. Le surnageant est centrifugé à 73000 g_{av} pendant 90 minutes à 4°C (rotor TLA-45, centrifugeuse TL100). Le culot, qui contient les membranes totales, est conservé à -20°C. Plus tard, il sera repris dans 100 µL de tampon de dépôt (voir analyse par SDS-PAGE, Chapitre II.4.f) L'analyse du contenu de la fraction membranaire s'effectue par western-blot.

d) Préparation des fractions membranaires C3 et C2 après croissance des levures en milieu riche

La souche de levure transformée par le vecteur d'intérêt est étalée sur boîte S6A puis incubée pendant 48 heures à 28°C. Les colonies obtenues sont ensemencées dans 5 mL de S6A pendant 24 heures, à 28°C et 180 rpm (préculture 1). 20 mL de S6A sont ensuite ensemencés avec la préculture 1 de façon à atteindre 0,1 DO_{600nm} (préculture 2). La préculture 2 est incubée à 28°C et 180 rpm pendant 24 heures. Le milieu riche YPGE2X (typiquement 430 mL) est préincubé dans des Fernbachs à 28°C et 130 rpm pendant la nuit (les Fernbachs sont bafflés pour permettre une meilleure oxygénation du milieu). Le lendemain, on ensemence le milieu YPGE2X à 0,05 DO_{600nm} avec la préculture 2 et on ajoute 12 mL d'éthanol à 96% et 50 mL de glucose à 10%. Les Fernbachs sont incubés à 28°C et 130 rpm pendant 36 heures : c'est la phase de croissance des levures pendant laquelle l'expression des protéines d'intérêt est réprimée par la présence de glucose. Au bout de ces 36 heures, le glucose est complètement consommé et l'éthanol est devenu le substrat sur lequel repose la croissance des levures. On réalise alors la première induction de l'expression : les Fernbachs sont placés dans l'eau glacée 10 minutes afin de diminuer la température rapidement puis on ajoute le galactose à la concentration de 20 g/L. Les Fernbachs sont alors incubés à 18°C et

130rpm. 13 heures plus tard, on réalise une seconde induction en ajoutant du galactose une deuxième fois, de nouveau à la concentration de 20 g/L. Les Fernbachs sont incubés à 18°C et 130 rpm pendant 5 heures de plus. La croissance des levures est suivie par mesure de la DO à 600nm.

Après la phase d'expression protéique, les Fernbachs sont placés dans de l'eau glacée pendant 10 minutes. La culture est centrifugée pendant 10 minutes à 4°C et 4000 g_{av} (rotor JLA8.1, J20XP). Les culots sont lavés avec de l'eau froide puis pesés (m_{culot} , environ 35 g par litre de culture). Les culots sont resuspendus avec 2 volumes équivalents au m_{culot} avec le tampon TEKS froid (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA; 0,6 M Sorbitol et 0,1 M KCl) et incubés pendant 15 minutes à 4°C. Le mélange est centrifugé pendant 10 minutes à 4°C et 4000 g_{av} (rotor JLA8.1, J20XP). Les culots sont congelés dans l'azote liquide et placés à -80°C.

Pour le fractionnement membranaire, les culots sont décongelés rapidement et repris par 1 volume équivalent au m_{culot} de tampon TES (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA; 0,6 M Sorbitol) auquel on a ajouté 1 mM de PMSF et 1X du cocktail d'inhibiteurs de protéases SigmaFast. Les cellules resuspendues dans le tampon TES sont placées dans un pot en agate et 1 volume équivalent de billes en verre de 0,5 mm de diamètre est ajouté (exemple : 100 mL de cellules resuspendues dans le tampon TES + 100 mL de billes). Les cellules sont broyées par pulvérisation : 3 minutes à 450 rpm; 30 secondes de pause; 3 minutes à 450 rpm en sens inverse (Pulverisette 6" planetary mill (Fritsch)). Le broyat est transvasé dans un cristallisateur, et les billes sont lavées 3 fois avec 0,5 volume équivalent au m_{culot} de tampon TES auquel on a ajouté 1 mM de PMSF et 1X du cocktail d'inhibiteurs de protéases SigmaFast. On obtient alors le Broyat Total (BT). Le Broyat Total est centrifugé à 700 g_{av} et 4°C pendant 20 minutes (rotor JLA10.5, J20XP). On obtient ainsi les fractions C1 et S1. Le surnageant S1 est centrifugé à 12000 g_{av} et 4°C pendant 20 minutes (rotor JLA10.5 sur J20XP). On obtient les fractions C2 et S2. Le surnageant S2 est centrifugé à 125000 g_{av} et 10°C pendant 1 heure (rotor Ti45, L8-M). On obtient les fractions C3 et S3. La fraction membranaire C3 est resuspendue par 0,2 volume équivalent au m_{culot} de tampon HEPES-Sucrose ((HS) ; 20 mM HEPES-Tris pH 7,5 ; 0,3 M Sucrose et 0,1 M $CaCl_2$) froid. Les fractions sont congelées dans l'azote liquide et stockées à -80°C.

Un prélèvement est effectué sur chaque fraction afin d'être analysé par dosage des protéines totales (dosage BCA) et par Western-Blot.

e) Dosage des protéines totales par la méthode BCA

La méthode BCA : cette méthode repose sur la capacité des liaisons peptidiques à réduire les ions Cu^{2+} du $CuSO_4$ en ion Cu^+ , dans un milieu alcalin (Smith et al., 1985). Les molécules d'acide bicinchoninique (BCA) vont ensuite pouvoir chélater les ions Cu^+ , ce qui va former un produit soluble de couleur pourpre qui a une absorption maximale à 562 nm. La quantité de protéines d'un échantillon de concentration inconnue sera déterminée par rapport à une courbe d'étalonnage réalisée avec des quantités connues de SAB (Sérum Albumine Bovine).

On réalise cette gamme de SAB soit dans le tampon TES (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA; 0,6 M Sorbitol), soit dans le tampon HS (20 mM HEPES-Tris pH 7,5 ; 0,3 M Sucrose et 0,1 M $CaCl_2$) avec des quantités de SAB comprises entre 0 et 80 μg , sur une plaque 96 puits. En effet, les différentes fractions sont suspendues dans l'un ou l'autre de ces tampons.

Trois dilutions différentes des échantillons de concentration inconnue sont testées : une au 1/10, une au 1/20 et une au 1/30. 10 μL des fractions diluées sont mélangés avec 5 μL de SDS 10% et 10 μL d'eau distillée dans une plaque de 96 puits. Les solutions de $CuSO_4$ et le BCA fournies par le fabricant

sont mélangées dans le rapport recommandé (1 volume de CuSO_4 pour 50 volumes de BCA) et 225 μL de ce mélange est ajouté aux échantillons. Les échantillons sont incubés à 37°C pendant 30 minutes et la DO est mesurée sur lecteur de plaque multiskan à 540 nm.

f) Analyse par SDS-PAGE

Les fractions à analyser sont d'abord mélangées avec le tampon de dépôt (concentration finale : 20 mM Tris-HCl pH 6,8 ; 0,5 mM EDTA ; 4,5 M Urée ; 2,5 % (p/v) SDS ; 0,005% (p/v) bleu de Bromophénol et 5% (v/v) β -Mercaptoéthanol) et incubées 10 minutes à 30°C. Ces fractions sont alors déposées sur un gel de polyacrylamide de type Laemmli (Laemmli, 1970) à 8%. La migration dure environ 1 heure 30 minutes à 110V maximum et 25 mA/gel dans un tampon de migration (25 mM Tris-base ; 250 mM glycine et 1% (p/v) SDS). Les protéines sont ensuite détectées par coloration au bleu de Coomassie, au nitrate d'argent ou par immunodétection (western-blot).

La coloration au Bleu de Coomassie est réalisée comme suit : les gels sont incubés 15 minutes avec la solution de coloration (40% (v/v) méthanol, 10% (v/v) acide acétique et 0,1% (p/v) de Bleu de Coomassie R250) puis décolorés au four micro-onde, dans de l'eau.

Pour la coloration au nitrate d'argent, le protocole est le suivant : Après rinçage dans de l'eau distillée, les gels sont incubés dans le tampon de fixation 1 (50% (v/v) méthanol ; 12% (v/v) acide acétique et 0,02% (v/v) formaldéhyde) pendant 1 heure, sur une balancelle. Le gel est ensuite incubé dans le tampon de fixation 2 (50% (v/v) éthanol) pendant 30 minutes puis pendant 1 minute précisément avec le tampon de fixation 3 (0,04% (p/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Le gel est lavé 3 fois pendant 20 secondes avec de l'eau distillée et il est incubé dans le tampon de coloration (0,2% (p/v) AgNO_3 et 0,03% (v/v) formaldéhyde) pendant 45 minutes ; le gel doit être protégé de la lumière à partir de ce moment. Le gel est ensuite lavé 2 fois pendant 30 secondes dans de l'eau distillée et il est incubé dans le tampon de développement (6% (p/v) Na_2CO_3 ; 1% (v/v) tampon de fixation 3 et 0,02% (v/v) formaldéhyde) jusqu'à obtenir l'intensité désirée pour les bandes d'intérêt. La réaction est arrêtée par le tampon d'arrêt (1% (v/v) acide acétique).

Dans tous les cas, le gel est lavé dans de l'eau distillée avant séchage. Le gel est ensuite séché toute la nuit entre deux feuilles de cellophane (tampon de séchage : 10% (v/v) éthanol, 10% (v/v) acide acétique et 5 % (v/v) de glycérol).

Pour le western-blot, après migration sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes, les protéines sont d'abord transférées sur une membrane PVDF (Millipore). Pour cela on utilise un tampon de transfert (27,8 mM Tris-base ; 38,5 mM glycine et 10% (v/v) méthanol, stocké à 4°C) et le transfert s'effectue à froid à 110V, 350 mA/montage pendant 1 heure. La détection des protéines transférées s'effectue en utilisant soit une sonde à base d'avidine (couplée à la peroxydase) qui va détecter toutes les protéines biotinylées, soit une autre sonde (couplée elle aussi à la peroxydase) qui va reconnaître les histidines, soit un anticorps primaire polyclonal de lapin dirigé contre le domaine compris entre les passages transmembranaires TM4 et TM5 de Drs2p (aimablement fourni par Todd Graham). Un anticorps primaire polyclonal de cochon d'inde dirigé contre SERCA1a (79B) et aimablement fourni par Anne-Marie Lompré a aussi été utilisé. Les anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre la protéine du *trans*-Golgi, Tlg2p, ou contre la protéine de la vacuole, Vam3p, ainsi que les anticorps monoclonaux de souris dirigés contre la protéine du réticulum endoplasmique, Dpm1p,

et ceux dirigés contre la protéine de la membrane plasmique, Pma1p, ont aussi été utilisés. Les anticorps secondaires sont couplés à la peroxydase. Les conditions d'utilisation sont décrites dans le Tableau 4.

Tableau 4. Conditions d'utilisation des sondes ou des anticorps utilisés pour l'immunodétection.

Anticorps primaire ou sonde				Anticorps secondaire			
Nom	Blocage	Lavage	Dilution et incubation	Nom	Lavage	Dilution et incubation	Lavage
Sonde Avidine	5% de lait écrémé, 1 heure	3 fois 10 minutes	1/25000, 1 heure				3 fois 10 minutes PBS-T et 2 fois 10 minutes PBS
Sonde Histidine	2% de SAB, 1 heure	-	1/2000, 2% de SAB, 1 heure				3 fois 10 minutes PBS-T et 2 fois 10 minutes PBS
Anti-Drs2p	5% de lait écrémé, 1 heure	-	1/5000, 5% de lait écrémé, 1 heure	Anti-lapin	3 fois 10 minutes	1/2000, 5% de lait écrémé, 1 heure	3 fois 10 minutes PBS-T et 2 fois 10 minutes PBS
Anti-Serca1a (79B)	5% de lait écrémé, 1 heure	-	1/20000, 5% de lait écrémé, 1 heure	Anti-cochon d'inde	3 fois 10 minutes	1/10000, 5% de lait écrémé, 1 heure	3 fois 10 minutes PBS-T et 2 fois 10 minutes PBS
Anti-Tlg2p ou anti-Vam3p	5% de lait écrémé, 1 heure	-	1/1000 ou 1/2000, 5% de lait écrémé, 1 heure	Anti-lapin	3 fois 10 minutes	1/2000, 5% de lait écrémé, 1 heure	3 fois 10 minutes PBS-T et 2 fois 10 minutes PBS
Anti-Dpm1p ou anti-Pma1p	5% de lait écrémé, 1 heure	-	1/1000 ou 1/3000, 5% de lait écrémé, 1 heure	Anti-souris	3 fois 10 minutes	1/2000, 5% de lait écrémé, 1 heure	3 fois 10 minutes PBS-T et 2 fois 10 minutes PBS

Toutes les étapes s'effectuent dans du tampon PBS-T contenant du PBS (2,7 mM KCl ; 0,14 M NaCl ; 0,1 M ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ; 1,8 mM KH_2PO_4 ; pH 7.4) supplémenté de 0,2% (v/v) de Tween 20 (sauf pour les derniers lavages, pour lesquels il n'y a pas de Tween 20).

La présence du produit de la réaction catalysée par la peroxydase est révélée par la méthode ECL™ (Enhanced Chemiluminescence, Amersham). Les images sont acquises par une caméra (G :BOX HR16, Syngene).

g) Déglycosylation de Cdc50p

- *Tests initiaux en conditions dénaturantes*

La déglycosylation a été initialement réalisée selon les recommandations du fournisseur. Brièvement, les membranes C3 sont diluées à 10 mg/mL dans le tampon HS (20 mM HEPES-Tris pH 7,5 ; 0,3 M Sucrose ; 0,1 M CaCl₂). 5 µL de cette dilution sont mélangés avec le tampon de dénaturation des protéines (40 mM DTT et 0,5% SDS) dans un volume final de 10 µL. Dans certains cas, les échantillons sont chauffés à 100°C pendant 10 minutes avant d'ajouter la glycosidase. Puis, pour un volume total de 20 µL, la glycosidase et son tampon sont ajoutés : tampon G5 (50 mM citrate de sodium à pH 5,5) pour l'Endoglycosidase H (5U/µg de protéines totales) ou tampon G7 (50 mM de phosphate de sodium à pH 7,5) supplémenté de 1% de NP-40 (v/v) pour la PNGase F (5U/µg de protéines totales). Les échantillons sont alors incubés 1 heure à 37°C puis analysés par Western-Blot.

- *Déglycosylation de Cdc50p en conditions non dénaturantes, et effet sur la mesure du dérivé phosphorylé*

Les membranes C3 sont diluées à 2 mg/mL dans le tampon de solubilisation SB (10 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 300 mM NaCl ; 20% (w/v) glycérol ; 5 mM MgCl₂) qui contient 1 mg/mL de DDM. Ces membranes sont incubées 0, 1 heure ou 2 heures à 37°C avant d'être incubées dans la glace pendant 15 minutes, en absence ou en présence de 10 µg/mL de PNGase F (*i.e* 20,000 U/ml), mais donc sans SDS dénaturant pour ces expériences. Les membranes sont ensuite diluées à 0,5 mg/mL dans le tampon A (100 mM KCl, 5 mM MgCl₂ et 50 mM Mops-Tris à pH 7) supplémenté de 0,1 mM de CaCl₂ et 1 mM d'EGTA. Les mesures de la formation de dérivé phosphorylé dans ces échantillons sont réalisées par filtration (voir ci-dessous).

II.5 Caractérisation fonctionnelle du complexe Drs2p/Cdc50p

a) Mesure de la formation de dérivé phosphorylé par le [γ -³²P] ATP (filtration)

- *Phosphorylation*

Pour la plupart des mesures, les membranes sont préincubées dans la glace, à 0,5 mg/mL de protéines totales, dans 200 µL de tampon A (100 mM KCl, 5 mM MgCl₂ et 50 mM Mops-Tris à pH 7), en général complété avec 100 µM de CaCl₂ et 1 mM d'EGTA. Divers détergents et divers lipides exogènes ont également parfois été ajoutés, à partir de stocks concentrés. Dans certains cas, on ajoute aussi de l'orthovanadate à 1 mM, ou d'autres inhibiteurs. La phosphorylation est initiée par l'ajout de [γ -³²P] ATP à 0,25-1 mCi/µmol, et en général à une concentration de 0,5 µM. La réaction est arrêtée au bout de 25-30 secondes en général, par précipitation avec 2 mL d'acide (500 mM TCA (acide TriChloroAcétique) supplémenté de 30 mM H₃PO₄). Les échantillons sont incubés 15 à 20 minutes dans la glace pour permettre l'agrégation des macromolécules, étape critique en présence de certains détergents. Les échantillons sont alors filtrés sur un ou deux filtres en fibre de verre de

type A/E et ces filtres sont rincés soigneusement avec de l'acide dilué (50 mM TCA supplémenté de 3 mM H_3PO_4). Les filtres sont alors insérés dans des fioles, où ils seront mis en contact avec un liquide scintillant (Picofluor 30, Packard) ; un compteur à scintillation nous donnera la mesure de la quantité de radioactivité retenue sur le filtre (Beckman, LS5801 ou LS6000IC).

- *Déphosphorylation*

Les cinétiques de déphosphorylation sont réalisées après que la phosphorylation ait atteint un état stationnaire (phosphorylation pendant 25 secondes dans la glace dans les conditions précédemment décrites). La déphosphorylation est déclenchée par l'ajout d'ATP non-radioactif (1 mM Mg^{2+} -ATP) ou d'ADP (1 mM), et, le plus souvent, transfert immédiat à 37°C. Deux protocoles différents ont été utilisés :

Le premier protocole, dit « avec dilution », consiste à diluer 5 fois l'échantillon phosphorylé (200 μL) dans le milieu de déphosphorylation (800 μL de tampon A supplémenté avec 100 μM de CaCl_2) contenant 5 mM de Mg^{2+} -ATP non-radioactif et pré-équilibré à 37°C. Lorsque la déphosphorylation a été réalisée à 4°C en présence de 1 mM d'ATP ou ADP, il a été ajouté 0,01 mg/mL de pyruvate kinase et 0,2 mM de phosphoénolpyruvate. La précipitation des protéines après différents temps de déphosphorylation est effectuée par ajout d'1 mL d'acide (1 M TCA et 60 mM H_3PO_4).

Le deuxième protocole, dit « sans dilution », consiste, après la phosphorylation dans la glace, à simplement transférer les 200 μL d'échantillon dans un tube pré-équilibré à 37°C et contenant 20 μL de Mg^{2+} -ATP non-radioactif à 10 mM.

Pour les mesures de déphosphorylation après coupure des étiquettes C-terminales de Drs2p-Bad et Cdc50p-His₁₀, les membranes ont été diluées à 2 mg/mL dans le tampon A supplémenté avec 100 μM de CaCl_2 puis incubées pendant 17 heures à 8°C, en présence ou absence de la protéase TEV, exprimée dans *E. coli* et purifiée par affinité comme décrit précédemment (Parks et al., 1994). Le protocole sans dilution a ensuite été appliqué.

b) Mesure du dérivé phosphorylé par autoradiographie d'un gel de type Sarkadi

Les gels de type Sarkadi (Sarkadi et al., 1986) sont des gels dénaturants de polyacrylamide (SDS-PAGE) dont le pH est acide, ce qui va permettre de stabiliser la liaison acyl-phosphate. Après phosphorylation et précipitation, les échantillons (lavés par centrifugations acides successives) sont déposés sur le gel et les différents polypeptides sont séparés selon leur taille. L'avantage principal de cette technique est qu'elle permet de détecter l'éventuelle contribution de divers polypeptides à la quantité de radioactivité totale mesurée.

La préparation des échantillons pour dépôt sur ce type de gel se fait comme suit : les échantillons sont phosphorylés ou déphosphorylés comme indiqué précédemment, mais le volume réactionnel est de 300 μL . La réaction est stoppée par addition de 300 μL d'acide (1 M TCA ; 60 mM d' H_3PO_4). Après 20 à 40 minutes de précipitation dans la glace, les échantillons sont centrifugés 2 minutes à 13000 rpm dans une centrifugeuse de type Jouan A14 placée dans la chambre froide. Le culot est lavé avec 50 mM de TCA et 3 mM d' H_3PO_4 . Le deuxième culot est alors repris par 60 μL de tampon de dépôt (150 mM Tris-HCl pH 6,8 ; 10 mM EDTA ; 2% (p/v) SDS ; 8 M urée ; 0,02% (p/v) Bleu de Bromophénol ; 5% (v/v) β -Mercaptoéthanol). 10 μL de chaque échantillon (25 μg de protéines totales s'il n'y a pas eu de pertes à la resuspension) est déposé sur un gel à 7% en acrylamide. La migration a

lieu dans un tampon de migration pour gel Sarkadi (170 mM Mops-Tris pH 6 et 0,1% (p/v) SDS) et en chambre froide, avec agitation (pour homogénéiser la température), pendant 3 heures à 10 mA/gel. Le gel est ensuite coloré au Bleu de Coomassie (40% (v/v) méthanol ; 10% (v/v) acide acétique ; 0,1% (p/v) Bleu de Coomassie R250) et décoloré dans 10% (v/v) d'acide acétique, 10% (v/v) de méthanol et 1% (v/v) de glycérol. Le lendemain, un écran de détection (Phosphorscreen) est exposé au gel et la radioactivité détectée est analysée à l'aide d'un Phosphorimager (Molecular Dynamics). Les quantités de Drs2p et de Cdc50p de chaque échantillon sont aussi analysées par Western-Blot.

c) Activité ATPasique

Les éluats 1 de la purification du complexe Drs2p/Cdc50p ou du complexe Drs2p^{D560N}/Cdc50p ont été mis en présence de DDM à 1 mg/mL et de 0,025 mg/mL (ou 0,125 mg/mL) de POPS, en présence ou en absence de 0,05 mg/mL de PI(4)P (ou 0,025 mg/mL). 1 ou 4 mg/mL de C₁₂E₈, ou 1 mM de vanadate, ou 1 mM de KF + 50 µM de BeCl₂ ont aussi été ajoutés, si souhaité. À t=0, 1 mM de Mg²⁺-ATP ont été ajoutés pour initier la réaction, en présence d'un système régénérateur d'ATP (1 mM PEP + 0,05 mg/mL PK). La réaction a été arrêtée à différents temps par 3,5 % de SDS. On ajoute ensuite un mélange ammonium molybdate/acide ascorbique (Lenoir et al., 2004) et la DO est mesurée à 850 nm après 2H d'incubation.

II.6 Purification du complexe Drs2p/Cdc50p

a) Tests de solubilisation en présence de différents détergent

Les membranes C3 sont diluées à 2 mg/mL de protéines totales dans le tampon de solubilisation SB (10 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 300 mM NaCl ; 20% (p/v) glycérol ; 5 mM MgCl₂) supplémenté avec 1 mM de PMSF et 1X du cocktail d'inhibiteurs de protéases de Roche. Le détergent est alors ajouté aux membranes à un ratio détergent/protéines totales (p/p) variable et le mélange est incubé de 15 minutes à 1 heure, à 4°C, sur une roue. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 88000 g_{av} pendant 1 heure à 4°C. La partie insoluble de l'échantillon sera ainsi collectée dans le culot et la partie soluble dans le surnageant. Pour l'analyse des échantillons par western-blot, le culot est repris avec un volume de tampon SB équivalent au volume du surnageant.

b) Purification par chromatographie d'affinité sur résine Ni²⁺-NTA

Principe : Les résines utilisées pour la chromatographie d'affinité de type IMAC résultent de l'immobilisation sur des billes d'agarose (phase stationnaire) d'ions métalliques tel le Nickel (Ni²⁺), par l'intermédiaire d'un linker, le NTA (NitriloTriacetic Acid). L'ion Nickel dispose de six liens de coordination dont quatre seront utilisés pour l'immobilisation par le NTA et deux seront utilisés pour la liaison avec l'azote du cycle de la chaîne latérale des histidines de l'étiquette.

L'inconvénient majeur est qu'il existe des protéines contenant naturellement des séquences répétées d'histidines dont il faut souvent se débarrasser par une autre étape. Certains autres acides aminés sont également susceptibles de créer des liaisons de coordination avec le Ni²⁺ et peuvent donc contribuer à contaminer l'échantillon.

Méthode : la solubilisation se déroule comme décrit précédemment (pour ces expériences, pendant 1 heure avec du DDM à un ratio DDM/protéines totales de 0,5/1 (g/g)). Toutes les

opérations s'effectuent en chambre froide ou dans la glace, en présence de 1 mM de PMSF et 1X d'un cocktail sans EDTA d'inhibiteurs de protéases (Roche).

La fixation se déroule après avoir équilibré la résine avec le tampon SB (10 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 300 mM NaCl ; 20% (p/v) glycérol ; 5 mM MgCl₂) supplémenté avec 1 mg/mL de DDM. Le ratio résine/protéines cibles (Cdc50p-His₁₀) est de 1 mL de résine pour 3 mg de protéines. La fraction solubilisée est alors mise en contact avec la résine toute la nuit à 4°C, sur une roue. Le lendemain, le non-retenu est récupéré par centrifugation à 500 g_{av} pendant 3 minutes (eppendorf 5430 centrifuge, rotor F35-6-30). La résine est alors lavée avec 4 volumes du tampon SB supplémenté de 0,2 mg/mL de DDM. Pour l'élution, la résine est resuspendue dans 2 volumes de tampon SB supplémenté de 0,2 mg/mL de DDM et de 250 mM d'imidazole, centrifugée à 500 g et à 4°C pendant 3 minutes (rotor F241.5P, Microfuge 22R). Cette opération est répétée une seconde fois. Finalement la résine est resuspendue dans 2 volumes de tampon SB supplémenté de 0,2 mg/mL de DDM. Après avoir prélevé un volume suffisant pour analyser les fractions, les éluats sont rassemblés et, pour diminuer la concentration d'imidazole, le mélange est dilué 10 fois dans le tampon SSR (50 mM Mops-Tris pH 7, 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂ et 20% (v/v) glycérol) supplémenté de 0,2 mg/mL de DDM, avant congélation dans l'azote liquide.

c) Purification par chromatographie d'affinité sur résine Streptavidine

Cette purification résulte de l'interaction forte (K_d de 10^{-15} M) et spécifique entre la streptavidine et la biotine. La streptavidine est couplée aux billes de sépharose, et interagit avec la biotine présente sur le domaine accepteur de biotine greffé en C-terminal de Drs2p. La biotine (ou vitamine H, Fig. 7) est synthétisée naturellement par de nombreux organismes, dont la levure *S. cerevisiae* ; elle sert notamment de cofacteur à certains enzymes. Dans la levure, il existe au moins cinq protéines biotinylées : l'acétyl-coA carboxylase cytosolique ou mitochondriale (250 kDa ou 242 kDa), l'urée amidolyase (202 kDa), la pyruvate carboxylase (2 isoformes, tous deux de 130 kDa) et le complexe Acyl-ARN, Arc1p (45 kDa). La fixation de la biotine sur ces protéines fait intervenir un domaine accepteur de biotine (Bad), à la structure très conservée (Fig. 7) : il forme une protéine globulaire constituée uniquement de feuillets β et qui expose la séquence reconnue pour la fixation covalente de la biotine. Le domaine accepteur de biotine utilisé ici en tant qu'étiquette provient de l'oxaloacétate décarboxylase de *Klebsiella pneumoniae* (Pouny et al., 1998). Les protéines recombinantes possédant ce domaine accepteur de biotine correctement replié et biotinylé se fixent à la streptavidine. Du fait de la forte interaction streptavidine-biotine, la dissociation ultérieure est difficile, et donc un site de clivage par une protéase (thrombine ou TEV) doit être ajouté aux constructions, entre la protéine d'intérêt et l'étiquette, pour permettre l'élution de la protéine d'intérêt. Cette stratégie permet aussi de se débarrasser des protéines naturellement biotinylées qui, elles, restent fixées à la résine.

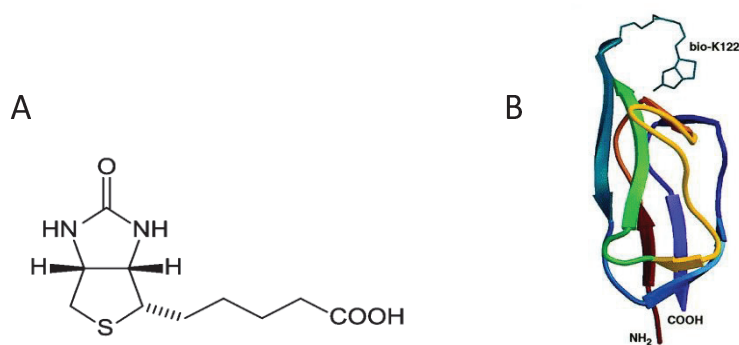


Figure 7. Structure de la biotine (A) et du domaine accepteur de biotine de la protéine BCCP (biotin carboxyl carrier protein) d'*E.coli* (B).

*Adapté de (Chapman-Smith and Cronan, 1999). Bio-K122 : Biotine liée à la Lysine 122 du domaine accepteur de biotine du BCCP d'*E.coli*.*

Cette technique a été utilisée de deux manières différentes : soit comme deuxième étape, au cours de la purification par affinité en tandem, soit comme seule et unique étape de purification par affinité.

Méthode : Dans le cas d'une seule étape, les membranes sont diluées à 2 mg/mL pour la solubilisation initiale. La solubilisation a lieu pendant 15 minutes et à 4°C sur la roue, dans le tampon SSR (50 mM de Mops-Tris pH 7, 100 mM de KCl, 5 mM de MgCl₂ et 20% (v/v) de glycérol) supplémenté avec 1 mM de PMSF et 1X du cocktail d'inhibiteurs de protéases SigmaFast, avec un ratio DDM/protéines totales de 1:1 (g/g) (*i.e.* légèrement plus élevé que précédemment). Après avoir équilibré la résine dans le tampon SSR supplémenté de 1 mg/mL de DDM, le solubilisé est mis en contact avec la résine Streptavidine pendant 2 heures à 4°C avec un ratio résine/protéine cible (Drs2p-Bad) de 1 mL/4 mg. Le non retenu est récupéré par centrifugation à 500 g pendant 3 minutes et à 4°C (Eppendorf 5430, rotor F35-6-30). La résine est alors lavée à 4°C par 3 volumes de tampon SSR supplémenté de 0,5 mg/mL de DDM, 1 mM de PMSF et, dans certains cas, 0,025 mg/mL de POPS ; cette opération est renouvelée trois fois. Pour l'élution, la résine est resuspendue dans 1 volume de tampon SSR supplémenté de 0,5 mg/mL de DDM, 1 mM de PMSF et, dans certains cas, 0,025 mg/mL de POPS. On ajoute alors 0,1 mg/mL de la protéase TEV et le mélange est incubé pendant la nuit à 4°C, sous agitation lente. On ajoute 1 volume de tampon SSR supplémenté de 0,5 mg/mL de DDM, 2 mM de PMSF, 1X du cocktail d'inhibiteurs de protéases (SigmaFast) et, dans certains cas, 0,025 mg/mL de POPS. Le mélange est centrifugé à 500 g (Eppendorf 5430, rotor F35-6-30) pendant 3 minutes et à 4°C. La résine est resuspendue avec 2 volumes de tampon SSR supplémenté de 0,5 mg/mL de DDM, 2 mM de PMSF, de 1X du cocktail d'inhibiteurs de protéases SigmaFast et, dans certains cas, 0,025 mg/mL de POPS puis le mélange est centrifugé à 500 g (Eppendorf 5430, rotor F35-6-30) pendant 3 minutes à 4°C. Cette opération est renouvelée une autre fois. Finalement, la résine est resuspendue dans 1 volume de tampon SSR supplémenté de 0,5 mg/mL de DDM, 2 mM de PMSF, de 1X du cocktail d'inhibiteurs de protéases SigmaFast et, dans certains cas, 0,025 mg/mL de POPS. Les fractions sont congelées dans l'azote liquide, conservées à -80°C et analysées par SDS-PAGE ainsi que par mesure du dérivé phosphorylé. Dans le cas de la purification en présence de C₁₂E₈, les tampons de lavage et d'élution contenaient 0,5 mg/mL de C₁₂E₈ au lieu du DDM. Dans le cas de la purification du complexe inhibé par le fluorure de béryllium, 50 µM de BeCl₂ et 1 mM de KF ont été ajoutés aux membranes C3 diluées à 2 mg/mL dans le tampon SSR,

puis tout au long de la purification. De plus, dans ce cas également, les tampons de lavage et d'élution contenaient 0,5 mg/mL de C₁₂E₈.

d) Filtration sur gel en HPLC

L'éluat (150 µL) issu de la purification en une seule étape sur résine Streptavidine a été analysé par filtration sur gel en HPLC. La colonne utilisée est une TSK-gel G3000SW_{XL} et l'HPLC est contrôlée par le System Gold de Beckman. Le tampon d'élution est un tampon contenant 20 mM TES-NaOH pH 7, 100 mM KCl, 1 mM MgCl₂ et 0,5 mM CaCl₂, supplémenté de 0,5 mg/mL de DDM et, dans certains cas, de 0,025 mg/mL de POPS. Les marqueurs (200 µL) sont injectés à 1 mg/mL (Biorad Calibration markers, Gel filtration Standard). Pour contrôle, du réticulum sarcoplasmique à 0,5 mg/mL est solubilisé pendant 5 minutes avec un ratio 10/1 (g/g) de DDM/protéines totales, puis centrifugé pendant 6 minutes à 100000 g_{av} (rotor TLA100, centrifugeuse TL100) ; le surnageant est ensuite injecté. Des fractions de 250 µL sont collectées, congelées dans l'azote liquide, conservées à -80°C et analysées par SDS-PAGE.

III.1 Expression dans la levure du complexe Drs2p/Cdc50p et premiers essais de caractérisation fonctionnelle

III.1.1 Introduction

L'objectif à long terme de ce travail étant de caractériser le transport de lipides catalysé par une ATPase P4 de levure, la protéine Drs2p, il a été nécessaire de mettre au point un système permettant la sur-expression de Drs2p. Par ailleurs, de précédentes études avaient montré l'importance de la protéine partenaire de Drs2p, Cdc50p, pour l'adressage et la fonction de Drs2p. C'est donc un système permettant la co-expression de Drs2p et de Cdc50p que nous avons décidé de mettre au point.

Des constructions de *DRS2* et *CDC50* avec différentes étiquettes en position 5' ou 3' ont été d'abord créées, afin de choisir l'une de ces constructions pour réaliser le vecteur de co-expression. La sélection de la construction adéquate a été réalisée après avoir analysé le niveau d'expression de Drs2p ou Cdc50p en milieu minimum, et sa capacité à restaurer la croissance à froid de levures délétées pour *DRS2* ou *CDC50*. En effet, la délétion des gènes de la levure *DRS2* ou *CDC50* empêche la croissance des levures à 20°C et aux températures plus basses, et ceci est une particularité associée à la délétion des ATPases P4 et des protéines CDC50 localisées dans le *trans*-Golgi puisque la délétion des ATPases Dnf1p et Dnf2p localisées dans la membrane plasmique n'empêche pas la croissance des levures aux basses températures (Chen et al., 1999; Saito et al., 2004). Ce test n'est pas très spécifique puisque la délétion de nombreuses protéines entraîne ce phénotype (Abe, 2007) et qu'on ne comprend pas encore à ce jour comment une « flippase » peut être impliquée dans un défaut de croissance à froid, mais il nous permet de cribler facilement et rapidement les différentes constructions réalisées.

Par ailleurs, une stratégie consistant à créer un vecteur de co-expression (plutôt que de transformer les levures avec deux vecteurs de simple expression) a été choisie, afin de mieux contrôler le nombre de copies de chacun des deux gènes dans la levure, et de faire en sorte que ces copies soient en nombre équivalent puisque ces deux protéines doivent fonctionner en complexe. Un vecteur de co-expression contenant *CDC50* et *DRS2*^{D560N} (qui est un mutant inactif de *DRS2*) a également été créé, afin d'avoir un contrôle négatif pour les expériences fonctionnelles ultérieures.

Les protocoles d'expression et de préparation des membranes utilisés ici ont été basés sur ceux déjà établis au laboratoire (Cardi et al., 2010; Jidenko et al., 2006). La qualité des membranes obtenues nous a permis de réaliser une première étude du cycle catalytique de Drs2p, en mesurant le dérivé phosphorylé formé à partir de l'ATP dans différentes conditions. Les données obtenues ont été publiées (Annexe 4) (Jacquot et al., 2012), et seront comparées dans la discussion à celles obtenues pour d'autres ATPase de type P.

III.1.2 Expression du complexe Drs2p/Cdc50p dans la levure *S. cerevisiae*

a) Sélection en milieu minimum de constructions portant les gènes *DRS2* et *CDC50* et possédant une étiquette clivable par la thrombine, et création du vecteur de co-expression

Ce travail avait déjà été réalisé avant mon arrivée au laboratoire. Afin de créer le vecteur de co-expression, la stratégie a été de créer, tout d'abord, des vecteurs de simple expression avec les différentes constructions de *DRS2* ou *CDC50* présentées dans la Figure 2 du Chapitre « Matériel et Méthodes ». Pour choisir l'une des constructions de *DRS2* et l'une des constructions de *CDC50*, nous avons d'abord évalué la capacité à s'exprimer et la fonctionnalité des différentes constructions de *DRS2* et de *CDC50* clonées dans les vecteurs de simple expression. Pour cela, un test de croissance des levures à basse température en milieu minimum (voir « Matériel et Méthodes », Chapitre II.3.j) et une préparation de membranes totales après croissance en milieu minimum (voir « Matériel et Méthodes », Chapitre II.4.c) ont été réalisés. Dans les deux cas, le milieu de croissance des levures contenait du galactose, puisque l'expression des différentes constructions est inducible par le galactose. Les résultats concernant *DRS2* sont présentés dans la Figure 1 et ceux concernant *CDC50* dans la Figure 2.

Comme le montre la Figure 1, la souche sauvage *DRS2* transformée par le vecteur pYeDP60 vide (témoin positif) pousse parfaitement bien à 20°C comme à 28°C, alors que la souche $\Delta drs2$ transformée par le vecteur vide (témoin négatif) ne pousse pas à basse température. La croissance de la souche $\Delta drs2$, transformée par les différentes constructions de *DRS2* obtenues, a ensuite été testée. La position de l'étiquette Bad n'a pas d'influence sur Drs2p puisque, dans tous les cas, on a restauration de la croissance à basse température de la souche $\Delta drs2$ (Fig. 1A) : que l'étiquette soit positionnée en N- ou C-terminal, on retrouve le même profil que pour la souche sauvage (*DRS2*). En revanche, pour *DRS2*^{D560N}, mutant inactif de *DRS2*, il n'y a pas de restauration de la croissance à basse température. Ceci suggère que l'activité de Drs2p est importante pour la croissance à basse température des levures délétées. Cependant, comme il a été montré que la mutation D560N de Drs2p altère fortement l'interaction de Drs2p avec Cdc50p (Lenoir et al., 2009), et que cette interaction est nécessaire pour l'export du complexe Drs2p/Cdc50p du RE vers le *trans*-Golgi (Saito et al., 2004), le défaut de restauration de la croissance des levures aux basses températures pourrait être dû à un défaut d'adressage dans les membranes du *trans*-Golgi.

Ce premier test suggère déjà que les différentes constructions de *DRS2* ou *DRS2*^{D560N} s'expriment dans la levure pendant la croissance en milieu minimum. Cette expression, quelle que soit la position de l'étiquette, sur les protéines Drs2p ou Drs2p^{D560N} biotinylées, a été confirmée par western-blot grâce à l'utilisation d'une sonde qui reconnaît spécifiquement les protéines biotinylées, la sonde avidine (Fig. 1B). En effet, on observe bien dans tous les cas l'apparition d'une bande à la masse moléculaire attendue lorsqu'on analyse le contenu des fractions membranaires préparées à partir de levures transformées par une des constructions de *DRS2*. La masse moléculaire apparente de la protéine correspondante est en adéquation avec celle attendue pour Drs2p-Bad, qui est de 163 kDa (Drs2p : ~154 kDa et Bad : ~9 kDa). En revanche, ce polypeptide n'apparaît pas lorsqu'on analyse les membranes préparées à partir de levures transformées par le vecteur vide. Les autres bandes révélées par la sonde avidine correspondent aux protéines naturellement biotinylées dans la levure

dont l'acétyl-CoA carboxylase 1 (Acc1p, ~250 kDa), la pyruvate carboxylase (isoformes 1 et 2, Pyc1/2p, ~130 kDa) et le complexe Acyl-ARN (Arc1p, ~42 kDa).

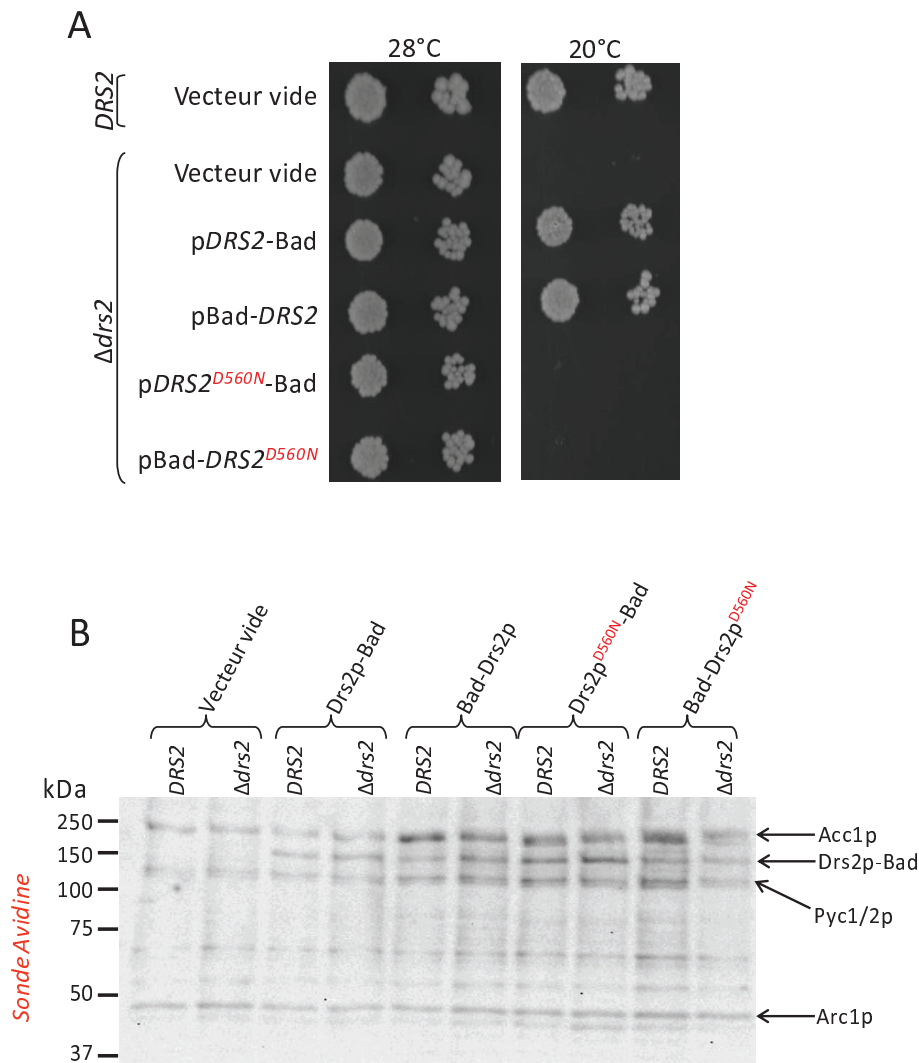


Figure 1. Test en milieu minimum de la restauration de la croissance des levures Δ drs2 à basse température (A) et de l'expression de Drs2p (B).

Les souches de levures sauvage (DRS2) ou délétée pour DRS2 (Δ drs2) ont été transformées par différents vecteurs ; pour contrôle, elles ont aussi été transformées par le vecteur vide. Dans ces vecteurs, le gène DRS2 sauvage et le gène muté sur son aspartate catalytique, DRS2^{D560N}, ont été étiquetés avec une séquence codant Bad en position 3' ou 5' (DRS2-Bad ou Bad-DRS2). **A.** Plusieurs dilutions de cultures de levures ont été déposées sur un milieu contenant 2% de galactose et 2% de fructose pour une croissance à 28°C (à gauche) ou à la température restrictive de 20°C (à droite), pendant 3 à 5 jours. **B.** Les membranes totales préparées à partir de 5 mL de culture en milieu minimum ($DO_{600nm} \sim 2$) ont été reprises dans 100 μ L de tampon de dépôt, et 0,2 μ L de ce mélange a été déposé sur SDS-PAGE. La détection de Drs2p-Bad, de Drs2p^{D560N}-Bad, de Bad-Drs2p, ou de Bad-Drs2p^{D560N}, a été effectuée à l'aide d'une sonde avidine. Acc1p (acétyl-CoA carboxylase, ~250 kDa), Pyc1/2p (pyruvate carboxylase, isoformes 1 et 2, ~130 kDa) et Arc1p (complexe Acyl-ARN, ~42 kDa) sont des protéines de la levure naturellement biotinylées.

Des expériences comparables pour différentes constructions de *CDC50* sont montrées sur la Figure 2. La souche sauvage *CDC50* transformée par le vecteur pYeDP60 vide (témoin positif) pousse parfaitement à 28°C et à 20°C alors que la souche $\Delta cdc50$ transformée par le vecteur vide (témoin négatif) montre le phénotype de sensibilité aux basses températures attendu. La souche $\Delta cdc50$ transformée par les différentes constructions de *CDC50* a ensuite été testée : la position de l'étiquette Bad ou la nature de l'étiquette (Bad ou His₁₀) n'a, de nouveau, pas d'influence sur la restauration, dans tous les cas, de la croissance à basse température de la souche $\Delta cdc50$ (Fig. 2).

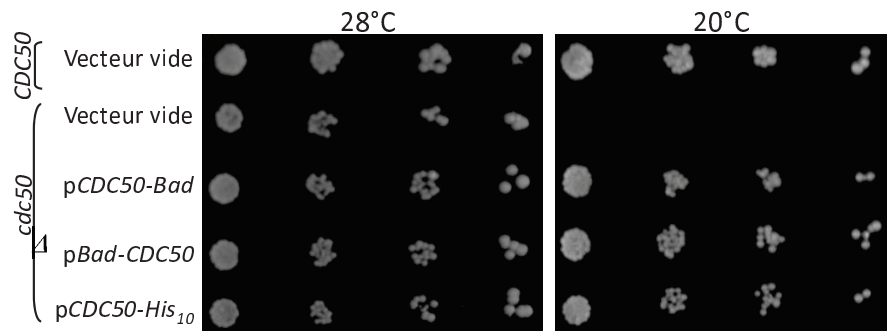


Figure 2. Test de restauration de la croissance des levures $\Delta cdc50$ à basse température.

Les souches de levures sauvages (*CDC50*) ou délétées pour *CDC50* ($\Delta cdc50$) ont été transformées par différents vecteurs. Pour contrôle, elles ont été transformées par le vecteur vide. Le gène *CDC50* a été étiqueté avec une séquence codant 10 histidines (His₁₀) en position 3' ou avec une séquence codant Bad en position 3' ou 5' (*CDC50-Bad* ou *Bad-CDC50*). Plusieurs dilutions de cultures de levures ont été déposées sur un milieu contenant 2% de galactose et 2% de fructose pour une croissance à 28°C (à gauche) ou à la température restrictive de 20°C (à droite), pendant 3-5 jours.

Nous avons décidé de sélectionner les constructions avec, pour Drs2p et Cdc50p, les étiquettes Bad et His₁₀ en C-terminal (voir discussion). Après cette sélection, le vecteur de co-expression a été créé (Fig. 3A).

La Figure 3A signale, sur les vecteurs de simple expression, la position d'un site unique de restriction pour *SbfI*. Nous avons en effet besoin d'un site unique de restriction afin de pouvoir insérer la cassette pro *GAL10/CYC1-CDC50-His₁₀-ter PGK* dans le vecteur pYeDP60_*DRS2*-Bad. Cette cassette a été amplifiée à partir de pYeDP60_*CDC50-His₁₀* en ajoutant, à chaque extrémité, le site de restriction *SbfI*. Le produit de la PCR résultant a été inséré dans pYeDP60_*DRS2*-Bad par ligation. Cette insertion est bidirectionnelle puisque nous avons utilisé une seule enzyme de restriction. Le sens de l'insertion doit donc être contrôlé. Pour cela, nous avons utilisé une enzyme de restriction qui permet de différencier le sens de l'insertion de la cassette dans le vecteur pYeDP60_*DRS2*-Bad.

Sur la Figure 3B, on peut voir que *DRS2* et *CDC50* clonés dans le vecteur de co-expression restaurent la croissance des souches $\Delta drs2$ ou $\Delta cdc50$. Notons toutefois qu'il aurait été plus adéquat, pour tester la capacité de notre vecteur de co-expression à restaurer la croissance à basse température, d'utiliser la souche délétée pour *DRS2* et pour *CDC50* ($\Delta drs2\Delta cdc50$). La Figure 3C confirme bien l'expression, en milieu minimum, de Drs2p-Bad et de Cdc50p-His₁₀. Pour cette deuxième protéine, la sonde histidine révèle cependant deux bandes principales au lieu d'une : on

verra plus tard que ces diverses bandes correspondent à des formes plus ou moins glycosylées de Cdc50p-His₁₀.

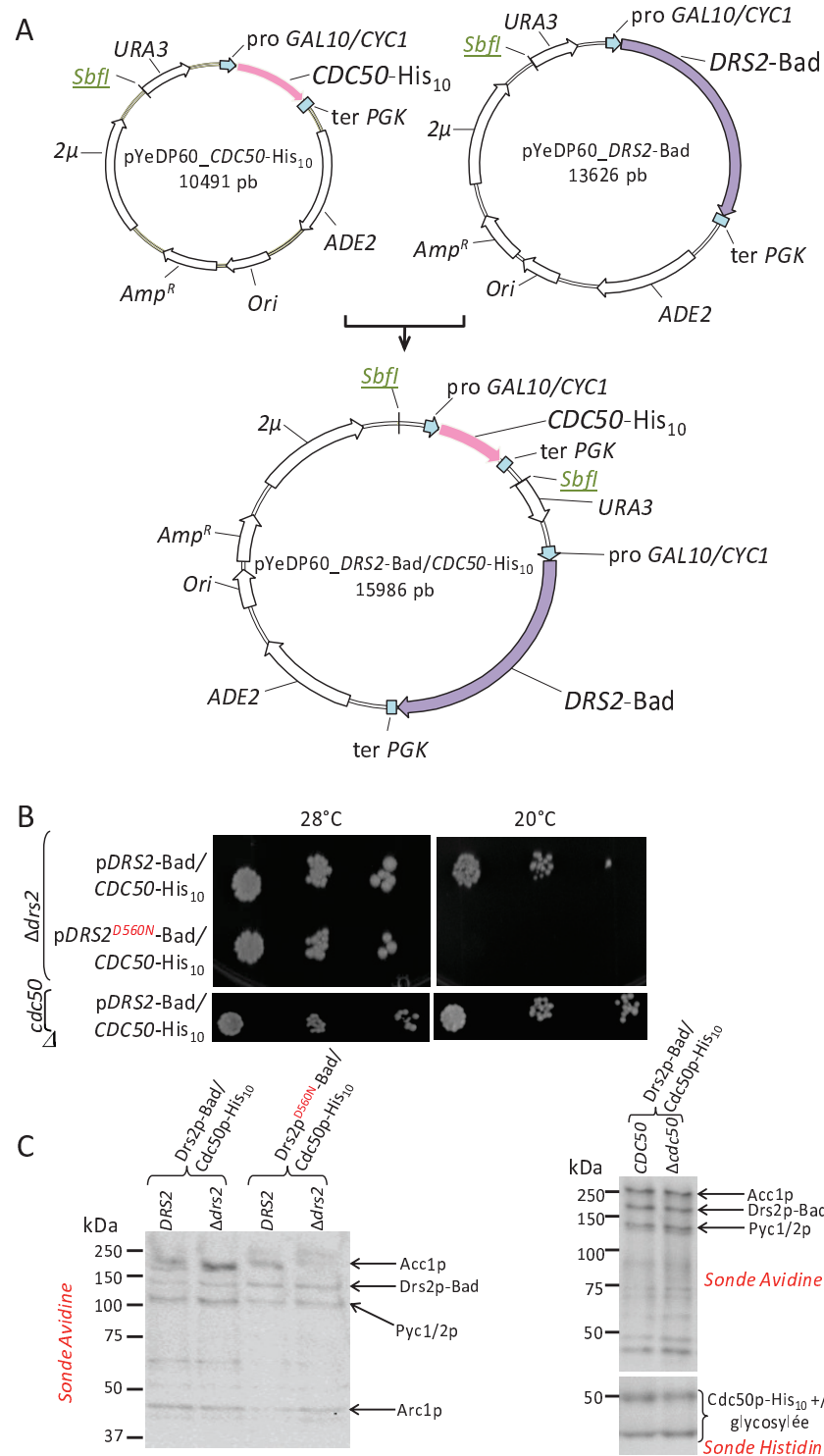


Figure 3. Carte des vecteurs de *simple* expression pYeDP60_DRS2-Bad et pYeDP60_CDC50-His₁₀, et du vecteur de *co*-expression pYeDP60_DRS2-Bad/CDC50-His₁₀ (A), test de restauration de la croissance des levures Δ *drs2* et Δ *cdc50* à basse température (B), et analyse de l'expression de Drs2p et de Cdc50p en milieu minimum (C). A. Le plasmide pYeDP60_DRS2-Bad contient le gène DRS2, étiqueté avec un domaine accepteur de biotine (Bad) du côté 3' et sous le contrôle d'un promoteur hybride fort GAL10/CYC1, inductible par le galactose (pro

*GAL10/CYC1). La séquence terminatrice est celle de la phosphoglycérate kinase (ter PGK). ADE2: marqueur de sélection pour l'adénine, Ori: origine de réplication bactérienne, Amp^R: gène de résistance à l'ampicilline, 2μ: origine de réplication de levure, URA3: marqueur de sélection pour l'uracile; SbfI indique la position des sites de coupure pour cet enzyme de restriction. Le plasmide pYeDP60_CDC50-His₁₀ porte les gènes décrits précédemment, sauf DRS2 qui est remplacé par CDC50. Ce dernier porte une étiquette de 10 histidines du côté 3'. Le plasmide pYeDP60_DRS2-Bad/CDC50-His₁₀, quant à lui, porte les deux gènes DRS2 et CDC50 sous le contrôle du promoteur GAL10/CYC1 et du terminateur de la PGK en plus des gènes déjà décrits. **B.** Les souches de levures sauvages (DRS2 ou CDC50), ou délétées pour DRS2 ($\Delta drs2$) ou pour CDC50 ($\Delta cdc50$), ont été transformées par différents vecteurs. Le gène DRS2 sauvage et le gène muté sur son aspartate catalytique, DRS2^{D560N}, ont été étiquetés avec une séquence codant Bad en position 3'. Le gène CDC50 a été étiqueté avec 10 histidines (His₁₀) en position 3'. Plusieurs dilutions de cultures de levures ont été déposées sur un milieu contenant 2% de galactose et 2% de fructose pour une croissance à 28°C (à gauche) ou à la température restrictive de 20°C (à droite), pendant 3-5 jours. **C.** Les membranes totales issues de la récolte de 5 mL de culture en milieu minimum ($DO_{600nm} \sim 2$) ont été reprises dans 100 μL de tampon de dépôt et 0,2 μL de ce mélange a été déposé sur SDS-PAGE. La détection de Drs2p-Bad ou Drs2p^{D560N}-Bad a été effectuée à l'aide d'une sonde avidine alors que la détection de Cdc50p-His₁₀ a été faite à l'aide d'une sonde histidine. Acc1p : acétyl-CoA carboxylase ; Pyc1/2p : pyruvate carboxylase, isoformes 1 et 2.*

b) Croissance en milieu riche et co-expression des protéines Drs2p-Bad et Cdc50p-His₁₀

- *Mise au point*

Après avoir créé le vecteur de co-expression, l'étape suivante a consisté à tester cette co-expression après croissance des levures à haute densité cellulaire, requise pour obtenir des quantités suffisantes des protéines Drs2p et Cdc50p pour les tests fonctionnels ultérieurs. Pour ce faire, nous nous sommes basés sur le protocole déjà mis au point au laboratoire pour l'expression de Serca1a-Bad (Cardi et al., 2010; Jidenko et al., 2006). Après 2 précultures en milieu minimum (de -75h à -49h et de -49h à -36h, Fig. 4), les levures ont été diluées en milieu riche pour poursuivre leur croissance. La présence du gène ADE2 sur le vecteur pYeDP60 permet de garder une pression de sélection car les milieux, même riches, deviennent rapidement carencés en adénine. Après 36 heures de croissance en milieu riche, alors que les levures ont quasiment atteint la phase stationnaire, l'expression de Drs2p et Cdc50p, à la température de 18°C, est déclenchée par une première addition de galactose, puis par une seconde addition, 13 heures après la première, pour 5 heures de plus. La masse de levures obtenue après croissance et induction est d'environ 35 g/L de culture, et l'absorbance à 600 nm atteint une valeur d'environ 10-15 (Fig. 4). Ces valeurs sont similaires à celles obtenues pour l'expression de Serca1a-Bad (Jidenko et al., 2006).

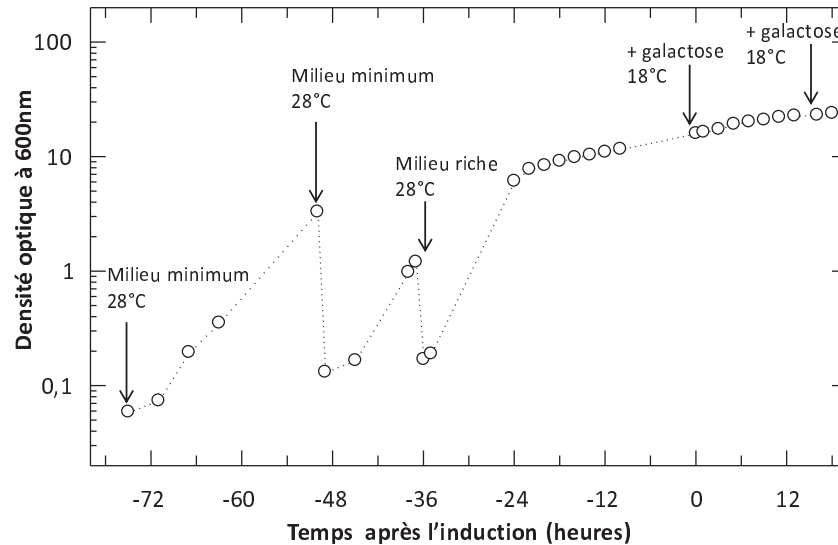


Figure 4. Courbe de croissance des levures W303.1b/*GAL4* transformées par le vecteur pYeDP60_DRS2-Bad/CDC50-His₁₀.

Les levures W303.1b/*GAL4* transformées par pYeDP60_DRS2-Bad/CDC50-His₁₀ ont été mises en culture, et la densité optique (DO) a été mesurée à 600 nm à différents moments de cette culture. Les précultures 1 (-75 à -49 heures) et 2 (-49 à -36 heures) en milieu minimum ont été représentées ainsi que la culture en milieu riche (-36 à +18 heures). Les additions de galactose, induisant la co-expression, ont également été représentées. Les températures indiquent la température à laquelle sont placées les cultures.

Après récolte des levures, ces dernières ont été broyées à l'aide d'une pulvérisette et différentes fractions membranaires ont été collectées par centrifugation différentielle (Fig. 5).

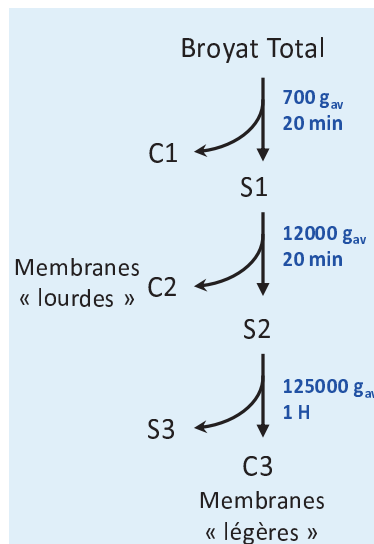


Figure 5. Schéma du protocole de fractionnement membranaire.

Après leur récolte, les levures W303.1b/*GAL4* contenant Drs2p et Cdc50p ont été broyées par une « pulvérisette » et le broyat total a été soumis à des centrifugations successives. La fraction membranaire C1, issue de la centrifugation à 700 g_{av} pendant 20 minutes, contient les cellules non cassées, les noyaux et les gros débris de membrane. La fraction membranaire C2, issue de la centrifugation du surnageant S1 à 12000 g_{av} pendant 20 minutes, contient les membranes dites « lourdes », et la fraction membranaire C3, issue de la centrifugation du surnageant S2 à 125000 g_{av} pendant 1 heure, contient les membranes dites « légères ».

Après détermination de la concentration en protéines des différentes fractions collectées et dépôt de quantités égales de protéines totales sur les différents puits d'un gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes, on peut analyser la quantité de Drs2p-Bad et de Cdc50p-His₁₀ contenue dans chaque fraction. La Figure 6 indique que Drs2p et Cdc50p sont enrichies dans les fractions membranaires C2 et C3, membranes dites « lourdes » et « légères », respectivement. On notera de nouveau, comme dans le cas de l'expression en milieu minimum, la présence de plusieurs bandes correspondant à Cdc50p-His₁₀ (reflétant probablement différents niveaux de glycosylation (Fig. 6, gel du bas)), et aussi la proportion de Cdc50p glycosylée plus forte dans la fraction C3 que dans la fraction C2.

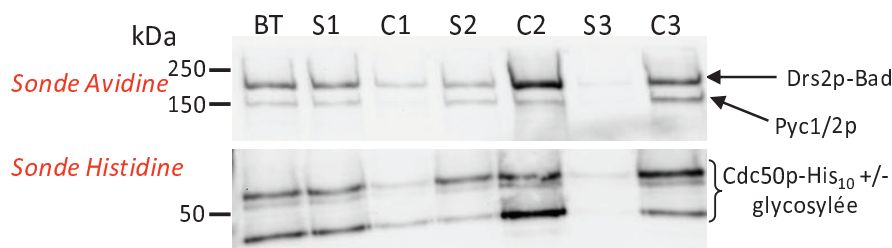


Figure 6. Analyse par western-blot des différents échantillons issus des fractions membranaires préparées par centrifugation différentielle à partir des levures contenant Drs2p-Bad et Cdc50p-His₁₀.

1 μ g de chaque fraction a été déposé sur SDS-PAGE. BT : Broyat Total. S1 et C1 : surnageant et culot issus de la centrifugation à 700 g_{av} du Broyat Total. S2 et C2 : surnageant et culot issus de la centrifugation à 12000 g_{av} du S1. S3 et C3 : surnageant et culot issus de la centrifugation à 125000 g_{av} du S2. Pyc1/2p : pyruvate carboxylase, isoformes 1 et 2, ~130 kDa. La détection de Drs2p-Bad a été effectuée à l'aide d'une sonde avidine alors que la détection de Cdc50p-His₁₀ a été faite à l'aide d'une sonde histidine.

Sachant maintenant que Drs2p et Cdc50p sont retrouvées principalement dans les fractions membranaires C2 et C3, nous avons cherché à définir plus finement la cinétique d'expression de ces deux protéines. Dans cette optique, des aliquots de culture ont été prélevés pendant la phase d'expression (de 0 à 18 heures, Fig. 7A) et un fractionnement membranaire par centrifugation différentielle (Fig. 5) a été réalisé comme précédemment. Les concentrations en protéines totales contenues dans les différentes fractions collectées ont été déterminées. Comme le montre la Figure 7A, la masse de levures et la concentration en protéines totales dans les différentes fractions collectées (dont C2 et C3) augmente peu au cours de la phase d'expression. Les fractions C2 et C3 ont également été analysées pour leur contenu en Drs2p et Cdc50p (Fig. 7B). Au contraire de la concentration en protéines totales, l'enrichissement en Drs2p-Bad augmente significativement dans les fractions C2 et C3, jusqu'à atteindre un maximum après 17-18 heures d'induction et parallèlement, l'enrichissement des protéines Pyc1/2p et Arc1p (protéines naturellement biotinylées de la levure) diminue (pour des raisons que nous ignorons). Cette diminution nous est favorable dans la perspective de la purification de Drs2p-Bad par chromatographie d'affinité sur résine streptavidine, puisqu'elle diminue la proportion des protéines biotinylées par la levure qui pourraient alors interférer avec la fixation de Drs2p-Bad à la résine streptavidine. L'analyse de l'expression de Cdc50p confirme que la proportion de Cdc50p glycosylée est plus grande dans les C3 que dans les C2 et indique de plus que la quantité de la forme glycosylée de Cdc50p augmente significativement dans les fractions C2 et C3, jusqu'à atteindre un maximum après 17-18 heures d'induction dans les C3, alors qu'elle diminue après 10 heures d'induction dans les C2.

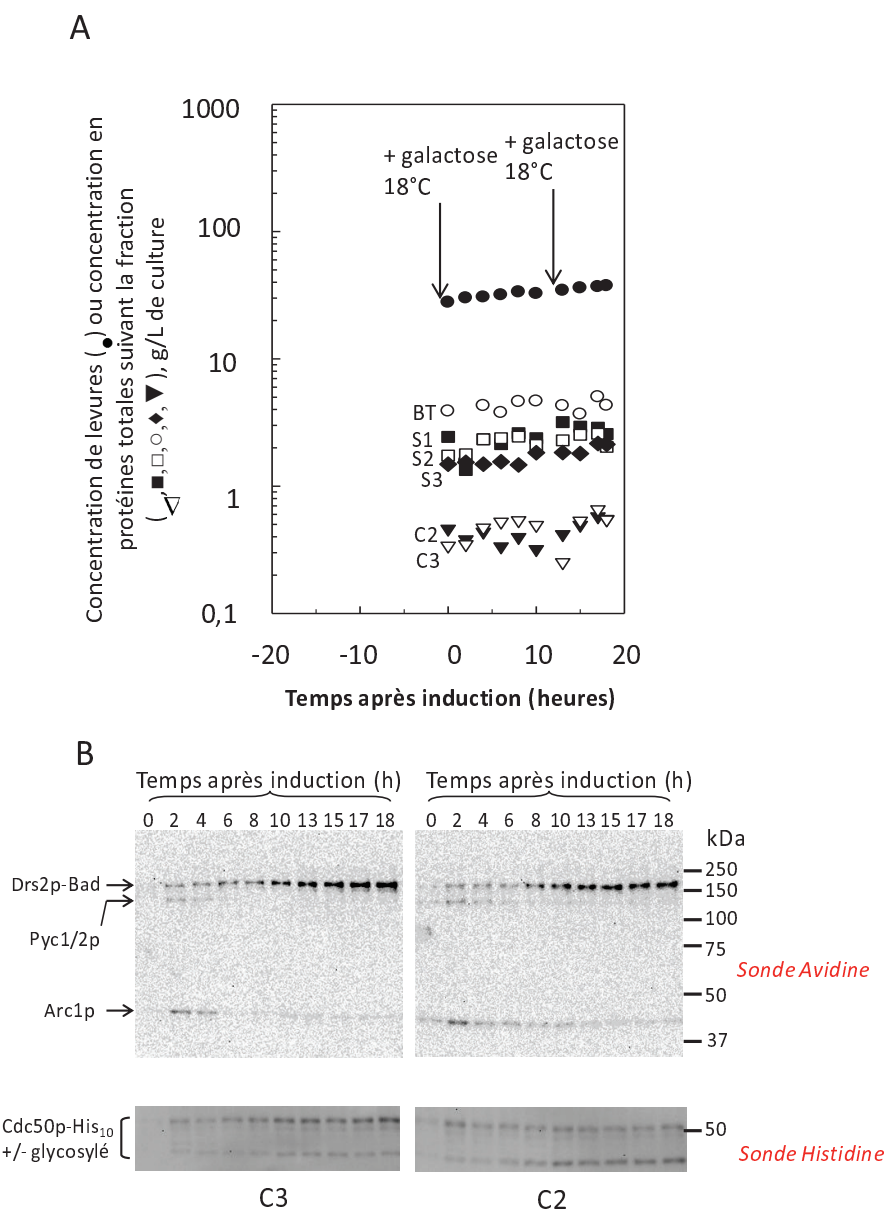


Figure 7. Cinétique d'expression de Drs2p et de Cdc50p lors d'une croissance en milieu riche.

A. Evolution de la masse des levures et de la concentration en protéines totales de différentes fractions obtenues par centrifugation différentielle. Des aliquots de 40 mL de culture sont prélevés à différents temps puis centrifugés à 4000 g_{av} pendant 3 minutes et à 4°C (rotor F35-6-30, Eppendorf 5430) puis lavés par de l'eau distillée. Les culots sont pesés (m_{culot} , ●) et resuspendus dans du tampon TEKS (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA; 0,6 M Sorbitol et 0,1 M KCl), centrifugés à nouveau, congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C. Plus tard, les culots sont décongelés rapidement et resuspendus dans 2 volumes équivalent au m_{culot} de tampon TES (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA; 0,6 M Sorbitol) supplémenté de 1 mM de PMSF. Des billes de verre de 0,5 mm de diamètre sont ajoutées et les cellules sont broyées en vortexant pendant 8 minutes dans la chambre froide. Le broyat est récupéré et les billes sont lavées, trois fois, par 1 volume équivalent au m_{culot} de tampon TES supplémenté de 1 mM de PMSF; on obtient le Broyat Total (BT, ○). Le Broyat Total est centrifugé à 700 g_{av} et 4°C pendant 20 minutes (rotor JA12, centrifugeuse J20XP); on obtient les fractions S1 (■) et C1 (non montré). Le surnageant S1 est centrifugé à 12000 g_{av} et à 4°C pendant 20 minutes (rotor JA20, centrifugeuse J20XP); on obtient les fractions S2 (□) et C2 (▼). Le surnageant S2 est centrifugé à 125000 g_{av} et 10°C pendant 45 minutes (rotor Ti50, centrifugeuse L8-M); on obtient les fractions S3 (◆) et C3 (▽). Le C3 a été resuspendu dans 0,2

volume équivalent au m_{culot} de tampon HS (20 mM HEPES-Tris pH 7,5, 0,3 M Sucrose et 0,1 M $CaCl_2$). Les différentes fractions ont été analysées par dosage des protéines totales par la méthode du BCA. **B.** Analyse, par western-blot, du contenu des fractions C2 et C3 en Drs2p-Bad et Cdc50p-His₁₀. 0,2 µg de protéines totales a été déposé sur SDS-PAGE. Pyc1/2p : pyruvate carboxylase ; Arc1p : protéine du complexe Acyl-ARN. La détection de Drs2p-Bad a été effectuée à l'aide d'une sonde avidine alors que la détection de Cdc50p-His₁₀ a été faite à l'aide d'une sonde histidine.

- Analyse de l'expression de Drs2p-Bad et de Cdc50p-His₁₀ en milieu riche

Nous avons d'abord voulu vérifier l'hypothèse selon laquelle les différentes bandes détectées pour Cdc50p-His₁₀ représentent effectivement différents niveaux de *N*-glycosylation, en incubant les membranes C3 contenant Drs2p et Cdc50p avec deux endoglycosidases, l'endoglycosidase H (EndoH) et la peptide : *N*-glycosidase F (PNGase F). L'EndoH clive les oligosaccharides enrichis en mannose entre deux *N*-acétyl-glucosamines, dont l'une est liée à l'asparagine porteuse de la glycosylation. La PNGase F, quant à elle, coupe entre l'asparagine et la première *N*-acétyl-glucosamine. La Figure 8 montre que l'incubation des membranes C3 contenant Drs2p et Cdc50p avec la PNGase F et l'EndoH conduit à la disparition des bandes correspondant à Cdc50p de plus haut poids moléculaire, au profit de bandes de poids moléculaire plus faibles. Ces résultats confirment donc que la protéine Cdc50p est *N*-glycosylée, que la bande de poids moléculaire le plus faible correspond à la protéine non glycosylée et que les bandes de poids moléculaires plus élevés correspondent à différents niveaux de glycosylation de Cdc50p (4 sites potentiels de glycosylation, cf. introduction). Le fait que, après coupure avec l'EndoH sans prétraitement à 100°C, même les polypeptides les plus rapides migrent un peu moins vite que le polypeptide le plus rapide du contrôle, est probablement dû au fait que l'EndoH laisse un résidu *N*-acétyl-glucosamine accroché à l'asparagine de la protéine. Dans ces expériences avec l'Endo H sans prétraitement à 100°C, la protéine Cdc50p initialement non glycosylée a pu être dégradée par les protéases de la levure. On peut également suspecter que les protéases impliquées ici sont de nature vacuolaire, pas seulement en raison du fait que le marqueur vacuolaire Vam3p est détecté dans les membranes C3 (voir Fig. 10), mais aussi en raison de la dégradation apparemment plus forte lorsque l'on utilise l'EndoH que lorsque l'on utilise la PNGase F. En effet, la déglycosylation par la PNGase F se fait à pH neutre, alors que la déglycosylation par l'EndoH se fait à pH 5,5, un pH plus proche du pH acide des vacuoles (pH 5) et donc plus favorable à l'activité des protéases vacuolaires.

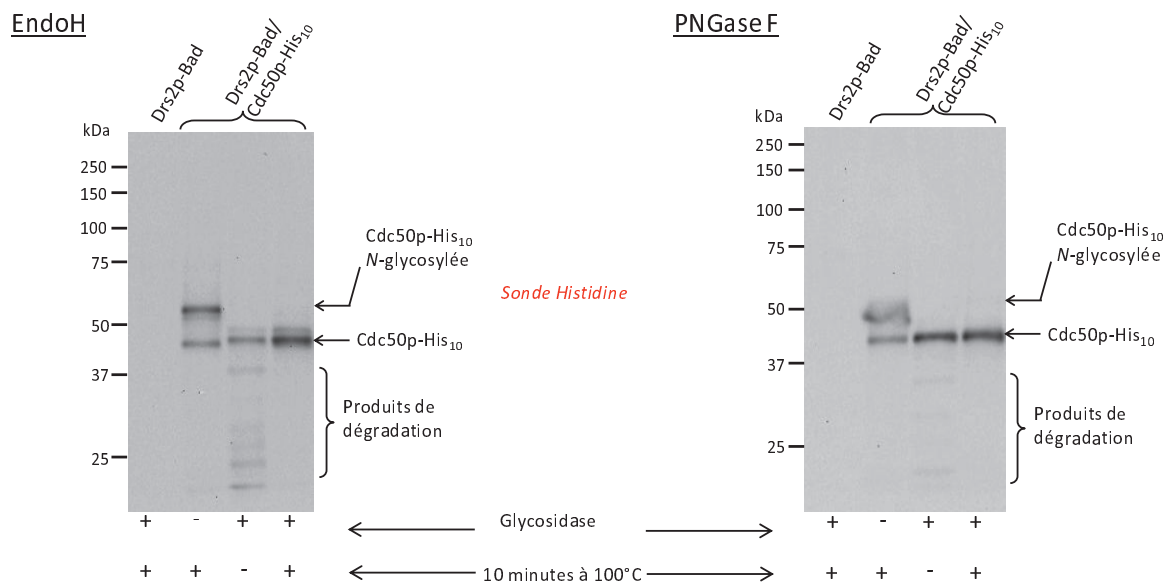


Figure 8. Tests de déglycosylation de Cdc50p-His₁₀ par l'EndoH et la PNGase F.

Les membranes C3 contenant soit Drs2p soit Drs2p et Cdc50p ont été diluées à 10 mg/mL dans le tampon HS (20 mM HEPES-Tris pH 7,5 ; 0,3 M Sucrose ; 0,1 M CaCl₂). 5 µL de cette dilution ont été mélangés volume à volume avec le tampon de dénaturation des protéines (40 mM DTT et 0,5 % SDS) (dans un volume final de 10 µL). Dans certains cas, les échantillons ont été chauffés à 100°C pendant 10 minutes avant d'ajouter la glycosidase. Puis, pour un volume total de 20 µL, la glycosidase et son tampon ont été ajoutés : tampon G5 (50 mM citrate de sodium à pH 5,5) pour l'Endoglycosidase H (5 U/µg de protéines totales) ou tampon G7 (50 mM de phosphate de sodium à pH 7,5) supplémenté de 1 % de NP-40 (v/v) pour la PNGase F (5 U/µg de protéines totales). Les échantillons ont alors été incubés 1 heure à 37°C puis 0,5 µg de protéines totales a été déposé sur SDS-PAGE. EndoH : Endoglycosidase H. PNGase F : peptide : N-glycosidase F. La détection de Cdc50p-His₁₀ a été réalisée à l'aide d'une sonde histidine.

À ce stade du travail, nous avons essayé d'estimer le niveau d'expression de Drs2p-Bad dans les membranes C3 contenant Drs2p et Cdc50p, en comparant son expression à celle de Serca1a-Bad. En effet, grâce à un anticorps dirigé contre Serca1a, dirigé vers le domaine A de l'ATPase, il est possible d'estimer la quantité de Serca1a-Bad exprimée dans les membranes de levures (Jidenko et al., 2006), par comparaison avec une gamme de Serca1a native, présente dans les membranes de réticulum sarcoplasmique préparées au laboratoire (Fig. 9). Le panneau A de la Figure 9 indique que pour une même quantité de protéines totales, l'intensité des bandes correspondant à Serca1a-Bad et à Serca1a native est du même ordre, suggérant que Serca1a-Bad est enrichie à environs 1,5 % dans les membranes C3. Si maintenant on utilise la sonde avidine pour comparer les levures exprimant Drs2p-Bad ou Serca1a-Bad, on voit sur le panneau B de cette même Figure que Drs2p-Bad semble être, quant à elle, environ 2 fois plus enrichie dans les membranes C3 que Serca1a-Bad. Ainsi, Drs2p-Bad représenterait environ 3% des protéines totales de la fraction membranaire C3.

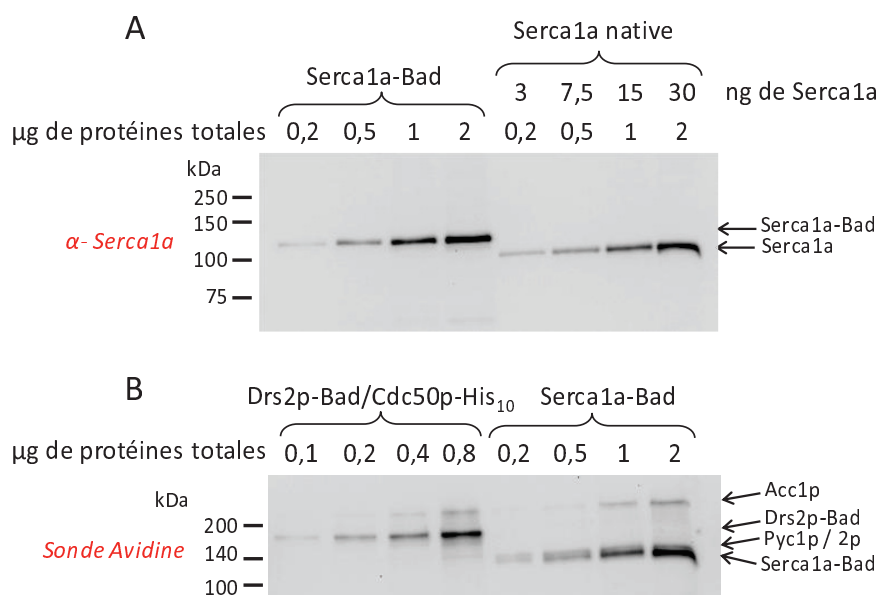


Figure 9. Estimation du niveau d'expression de Drs2p-Bad dans les membranes C3.

A. Quantification de l'expression de Serca1a-Bad dans les membranes C3, par comparaison avec des membranes du réticulum sarcoplasmique. Des membranes de réticulum sarcoplasmique ont été ajoutées à des membranes contrôles de levure n'exprimant ni Serca1a ni Drs2p/Cdc50p, de façon à ce que l'ATPase Serca1a native ne représente que 1,5 % des protéines totales. Serca1a dans les deux échantillons a été détectée à l'aide d'un anticorps dirigé contre le domaine A de Serca1a (A79). **B.** Comparaison de l'expression de Serca1a-Bad et de Drs2p-Bad dans les membranes C3 exprimant l'une ou l'autre de ces protéines. Acc1p : acétyl-CoA carboxylase ; Pyc1/2p : pyruvate carboxylase. Les protéines biotinylées ont été détectées à l'aide d'une sonde avidine.

Les Figures 6 et 7 indiquent que ce sont les membranes C3 qui contiennent la plus forte proportion de Cdc50p glycosylée. Cette observation nous a conduit à penser que la protéine Cdc50p contenue dans les membranes C3 avait atteint des compartiments plus tardifs dans la voie sécrétoire, compartiments au sein desquels les glycosylations avaient été plus complètes. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons analysé les fractions membranaires C2 et C3 pour leur contenu en protéines Tlg2p et Dpm1p, qui sont respectivement des marqueurs des membranes du *trans*-Golgi et du réticulum endoplasmique. Sur la Figure 10, où on analyse avec différents anticorps le contenu des fractions membranaires C2 et C3 obtenues après co-expression de Drs2p-Bad avec Cdc50p-His₁₀, on trouve des quantités de Drs2p-Bad voisines dans les membranes C3 et C2, et surtout une proportion plus importante de Cdc50p-His₁₀ et glycosylée dans les membranes C3 que dans les membranes C2, comme observé précédemment (Fig. 6 et 7). Si on analyse maintenant le contenu en protéine Tlg2p de ces fractions membranaires C2 et C3, alors on observe que ce marqueur du *trans*-Golgi est enrichi dans la fraction membranaire C3, ce qui indique que les membranes de *trans*-Golgi sédimentent majoritairement dans ces membranes C3. Ceci est compatible avec l'observation d'une glycosylation plus complète de la protéine Cdc50p contenue dans les membranes C3 que dans les membranes C2. Le marqueur du réticulum endoplasmique, Dpm1p, est présent de façon équivalente dans les deux fractions membranaires.

Dans l'optique de posséder un contrôle négatif pour nos tests fonctionnels ultérieurs, nous avons aussi analysé le contenu des fractions membranaires C2 et C3 obtenues après co-expression avec Cdc50p-His₁₀ d'un mutant inactif de Drs2p, Drs2p^{D560N}-Bad. Il est intéressant de noter que dans ce cas

là, Cdc50p-His₁₀ est majoritairement exprimée sous forme non glycosylée dans les deux fractions membranaires, même si la forme glycosylée semble légèrement plus abondante dans la fraction membranaire C3.

Indépendamment, nous avons aussi analysé les fractions membranaires C2 et C3 pour leur contenu en marqueurs de la vacuole (Vam3p) et de la membrane plasmique (Pma1p). Ces deux marqueurs sédimentent majoritairement dans les membranes C3 lorsqu'il y a sur-expression des protéines Drs2p et Cdc50p (Fig. 10), mais, de façon inattendue, pas en l'absence de sur-expression de ces dernières. Ceci semble indiquer que la sur-expression de Drs2p et Cdc50p altère le trafic vers les membranes vacuolaires et plasmiques, puisque ces marqueurs ne sédimentent plus majoritairement dans les membranes dites « lourdes » (C2) mais plutôt dans les membranes dites « légères » (C3). Notons que l'enrichissement en membranes dérivées du *trans*-Golgi dans la fraction membranaire C3 est également observé dans le cas de membranes contrôles (Fig. 10, « vecteur vide »).

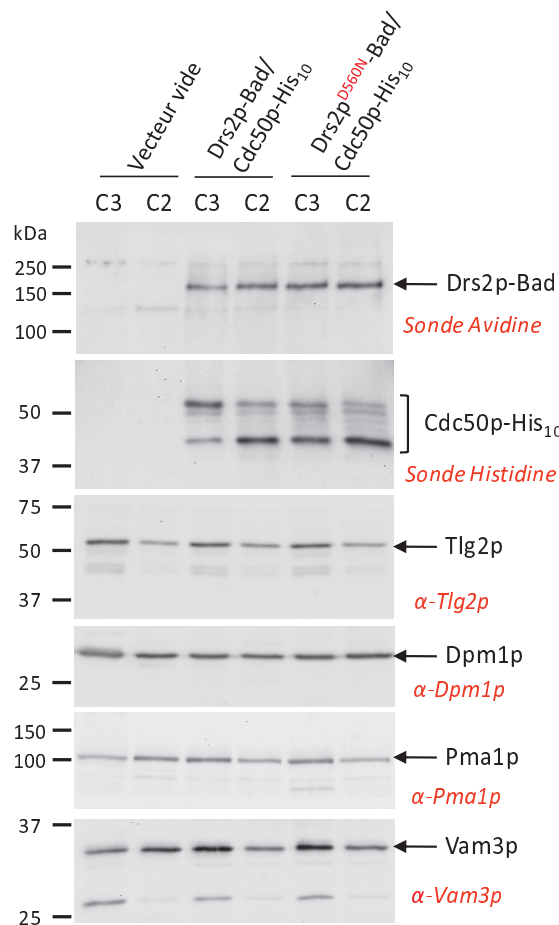


Figure 10. Analyse du contenu des fractions membranaires C2 et C3 à l'aide de marqueurs de différents compartiments membranaires.

Les fractions membranaires C2 et C3 ont été préparées après co-expression de Drs2p ou Drs2p^{D560N} avec Cdc50p en milieu riche. Pour contrôle, des membranes préparées à partir d'une culture de levures transformées par un vecteur vide ont été incluses. Pour la détection de Drs2p-Bad et Cdc50p-His₁₀ avec les sondes avidine ou histidine, 0,4 µg de protéines totales a été déposé sur SDS-PAGE. Pour la détection de Tlg2p avec l'anticorps polyclonal α-Tlg2p, de Pma1p avec l'anticorps monoclonal α-Pma1p et de Vam3p avec l'anticorps polyclonal α-Vam3p, 5 µg de protéines totales ont été déposés sur SDS-PAGE. Pour la détection de Dpm1p avec l'anticorps monoclonal α-Dpm1p, 20 µg de protéines totales ont été déposés sur SDS-PAGE.

c) Discussion

Nous avons construit un vecteur de co-expression possédant les gènes *DRS2* et *CDC50* et permettant leur expression co-ordonnée à haute densité cellulaire. En effet, la plupart des stratégies de co-expression sont basées sur la co-transformation des cellules avec des vecteurs multi-copies portant chacun un seul des gènes à co-exprimer. Dans ces conditions, il est impossible de contrôler le nombre de copies de chaque vecteur dans chaque cellule, ce qui peut conduire à de fortes variations du niveau d'expression des deux gènes d'une cellule à l'autre. De plus, des vecteurs commerciaux permettant la co-expression de plusieurs gènes (par exemple les vecteurs pESC) existent, mais ils ne permettent pas la croissance des levures à haute densité cellulaire.

Plusieurs constructions des gènes codant *DRS2* et *CDC50* ont été réalisées dans le but de tester l'effet de différentes étiquettes et de leur positionnement sur le niveau d'expression et la fonction de ces deux protéines. Toutes ces constructions permettent l'expression de Drs2p et Cdc50p à des niveaux comparables, mais aussi la restauration de la croissance à basse température des levures $\Delta drs2$ et $\Delta cdc50$. Etant donné que l'extrémité N-terminale de Drs2p pourrait perturber les mouvements du domaine A impliqué dans la déphosphorylation, comme pour les autres ATPases de type P (Clausen et al., 2004; Toyoshima et al., 2000), la construction portant le gène *DRS2* avec une étiquette Bad en 3' (en C-terminal de la protéine) a été choisie. Pour ce qui est de Cdc50p, la position N- ou C-terminale ne semble pas non plus influencer la fonctionnalité de la protéine. Des travaux antérieurs avaient déjà montré que la fusion d'une étiquette GFP en C-terminal de Cdc50p était sans effet sur sa localisation (Saito et al., 2004), et nous avons donc choisi aussi pour Cdc50p de placer l'étiquette en C-terminal. Comme nous avions initialement le projet de réaliser une purification par affinité en tandem du complexe éventuel entre Drs2p et Cdc50p, c'est une étiquette de 10 histidines qui a été choisie pour Cdc50p.

Notre stratégie nous a permis d'obtenir de grandes quantités des protéines Drs2p-Bad et Cdc50p-His₁₀. En effet, à partir de 1 litre de culture, 200-250 mg de protéines totales sont obtenues dont environ 3% correspondent à Drs2p-Bad (soit ~10 mg). Ceci représente environ le double du niveau d'expression obtenu au laboratoire pour Serca1a-His₆ (Lenoir et al., 2002) et le triple du niveau d'expression obtenu pour Serca1a-Bad (Jidenko et al., 2006), toutes deux clonées dans le même plasmide pYeDP60. Si l'on compare maintenant l'expression de Drs2p-Bad dans la présente étude à celle de Drs2p réalisée dans d'autres laboratoires, la conclusion est la suivante : alors que de précédentes surexpressions de Drs2p dans la levure avaient permis d'augmenter d'un facteur 10 (Zhou and Graham, 2009), ou même 20 (Lenoir et al., 2009) la quantité de Drs2p exprimée de façon hétérologue par rapport à la quantité de Drs2p endogène, nous estimons, dans notre cas, avoir multiplié la quantité de Drs2p par au moins deux ordres de grandeur par rapport à la quantité de Drs2p endogène.

Le protocole de préparation des membranes nous permet d'obtenir deux types de fractions membranaires. Afin d'en choisir une pour réaliser la caractérisation fonctionnelle du complexe, nous avons analysé le contenu de ces fractions. La fraction C2, contenant les membranes dites « lourdes » contient principalement une version non glycosylée de Cdc50p, contrairement à la fraction C3 contenant les membranes dites « légères ».

La première étape de *N*-glycosylation dans la levure implique le transfert, au niveau du réticulum endoplasmique, d'un oligosaccharide préformé sur un Dolichol-pyrophosphate (lipide polyisoprénoïde) sur le groupe amide d'une asparagine présente dans une séquence Asn-X-Thr/Ser, où X peut être n'importe quel acide aminé sauf une proline. Le précurseur oligosaccharidique préformé est : Glc₃Man₉GlcNAc₂. On l'appelle aussi « core oligosaccharide », et il est ensuite modifié par les glycosidases du réticulum endoplasmique (RE) et du Golgi, et par les glycosyltransférases du Golgi.

Nous avons pensé que la forme non glycosylée de Cdc50p était une forme immature qui n'avait pas encore migré vers l'appareil de Golgi. L'utilisation de marqueurs d'organelles nous a permis de vérifier cette hypothèse. Nos résultats suggèrent que Cdc50p subit une addition de mannoses dans les citernes de l'appareil de Golgi puisque nous observons une corrélation entre l'augmentation du nombre de résidus glycosidiques et l'enrichissement en membranes dérivées du *trans*-Golgi. Comme le complexe Drs2p/Cdc50p est localisé, *in vivo*, au niveau du réseau *trans*-Golgien (Chen et al., 1999; Gall et al., 2002; Hua et al., 2002; Natarajan et al., 2004; Saito et al., 2004), ces résultats nous ont fait penser que l'utilisation des C3 pour la caractérisation fonctionnelle du complexe serait le meilleur choix.

Concernant le mutant inactif de Drs2p, Drs2p^{D560N}, nous avons vu que Cdc50p associée à ce mutant présente un faible taux de glycosylation, même dans les membranes C3. Sachant que l'interaction entre Drs2p et Cdc50p est obligatoire pour l'export de ces protéines du réticulum endoplasmique vers le *trans*-Golgi (Saito et al., 2004), ces résultats corroborent une étude précédente qui montrait que la mutation de l'aspartate catalytique de Drs2p altérait l'interaction avec Cdc50p, *in vivo* et *in vitro* (Lenoir et al., 2009).

III.1.3 Caractérisation fonctionnelle du complexe Drs2p/Cdc50p exprimé dans la levure *S. cerevisiae*

Pour cette caractérisation, nous avons tiré parti du fait que les ATPases de type P s'auto-phosphorylent transitoirement au cours de leur cycle catalytique. Cette autophosphorylation doit *a priori* avoir lieu sur l'aspartate 560 de Drs2p, qui fait partie du motif DKTGLT conservé parmi toutes les ATPases de type P. Ainsi, nous avons mesuré la formation de dérivé phosphorylé à l'état stationnaire à partir de [γ -³²P]ATP pour les fractions membranaires C2 et C3 des levures exprimant Drs2p. Cette mesure de formation de dérivé phosphorylé a été réalisée en absence ou en présence d'orthovanadate (vanadate ou VO₄), un inhibiteur, entre autres, des ATPases de type P, qui interagit de manière réversible avec la forme E2 non phosphorylée de ces dernières.

a) Phosphorylation de Drs2p dans les fractions membranaires C2 et C3

Les résultats précédents nous ont amené à penser que la fraction membranaire C3 pourrait être la plus adaptée pour les tests ultérieurs visant à évaluer la fonction de Drs2p, puisqu'elle est enrichie en membranes dérivées du *trans*-Golgi, localisation attendue du complexe, et que Cdc50p présente le plus fort niveau de glycosylation dans ces membranes. Pour vérifier cette hypothèse, la quantité de dérivé phosphorylé formé sensible au vanadate a été mesurée dans les fractions membranaires C2 et C3 (Fig. 11), et elle s'est avérée être, pour les membranes C3, 3 fois supérieure à celle mesurée pour les membranes C2. Par conséquent, nous avons continué notre étude du fonctionnement des protéines Drs2p et Cdc50p en utilisant les membranes C3.

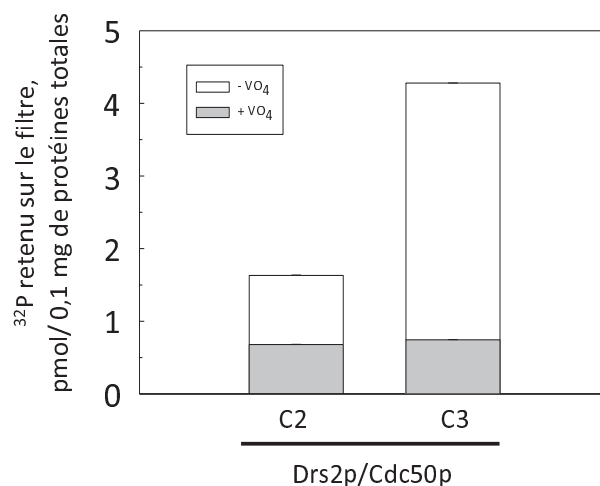


Figure 11. Comparaison de la formation de dérivé phosphorylé par le $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ dans les fractions membranaires C3 et C2.

Les membranes C3 et C2 de levures sur-exprimant Drs2p-Bad et Cdc50p-His₁₀, ont été préincubées dans la glace à 0,5 mg/mL de protéines totales, dans 200 μL de tampon A (100 mM KCl, 5 mM MgCl₂ et 50 mM Mops-Tris à pH 7) complété avec 100 μM de CaCl₂. Après 5 à 10 min d'incubation, en absence ou en présence de 1 mM d'orthovanadate (VO₄), toujours à 4°C, la phosphorylation a été déclenchée par l'addition de $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ à une concentration finale de 0,5 μM , puis la réaction a été stoppée après 30 secondes par addition d'acide. Après précipitation pendant 15-20 minutes sur la glace, les protéines ont été filtrées et la radioactivité associée au filtre a été mesurée par scintillation.

b) La co-expression de Cdc50p avec Drs2p est cruciale pour la phosphorylation de Drs2p

Comme il a déjà été montré que les protéines Cdc50p et CDC50A sont indispensables pour la phosphorylation, par l'ATP, de Drs2p et de ATP8B1 (ou ATP8B2) purifiées ((Bryde et al., 2010; Lenoir et al., 2009)), nous avons en premier lieu cherché à déterminer si dans notre système d'expression Drs2p était également dépendante de la co-expression avec Cdc50p.

Pour ce faire, différents échantillons de membranes C3 ont été soumis à une phosphorylation par le $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$. Comme on peut le voir sur la Figure 12, lorsqu'on exprime Drs2p seul, il n'y a quasiment pas de formation de dérivé phosphorylé sensible au vanadate. À partir du moment où Cdc50p est co-exprimée avec Drs2p, la fraction du dérivé phosphorylé sensible au vanadate augmente significativement (~2,5 pmol/ 0,1 mg de protéines totales). Ce signal est, de plus, spécifique de Drs2p puisque les membranes exprimant une version inactive de Drs2p (D560N) ne montrent pas de dérivé phosphorylé sensible au vanadate. Pour contrôle, une mesure de la formation de dérivé phosphorylé par la protéine Serca1a native a été réalisée. Pour cela, des membranes C3 issues de la culture des levures W303.1b/GAL4 transformées par le vecteur vide ont été mélangées avec des membranes du réticulum sarcoplasmique, et ce afin d'obtenir un mélange avec environ 2 % de Serca1a native. On a obtenu ainsi pour Serca1a, comme attendu, la formation d'un dérivé phosphorylé (~8 pmol/ 0,1 mg de protéines totales) dépendant de la présence de calcium. En présence d'EGTA (Fig. 12 ; barre noire), qui chélate le calcium, le signal de phosphorylation a été diminué jusqu'au niveau observé en présence de vanadate pour les membranes C3 contenant Drs2p seul, Drs2p et Cdc50p, ou Drs2p^{D560N} et Cdc50p. Notons que la protéine Serca1a, elle, n'est que très peu sensible au vanadate (Fig. 12 ;

barre grise) ; ceci sera discuté plus tard (Fig. 15) mais correspond bien aux résultats décrits dans la littérature.

Notons aussi que les échantillons qui ont servi aux expériences de phosphorylation ont également été déposés sur SDS-PAGE et que l'analyse par western-blot a indiqué que la quantité de Drs2p était bien la même dans chacun de ces échantillons de membranes C3 (Fig. 12). L'insensibilité au vanadate des membranes C3 exprimant Drs2p seul ou co-exprimant le mutant inactif avec Cdc50p, confirme que les protéines Drs2p et Cdc50p endogènes sont en quantité négligeable par rapport aux protéines sur-exprimées. Les résultats que nous obtenons avec notre système de co-expression confirment les travaux antérieurs, à savoir le rôle crucial de la co-expression initiale avec Cdc50p pour la capacité ultérieure de Drs2p à être phosphorylée par l'ATP. Par ailleurs, ces résultats suggèrent la formation possible d'un complexe Drs2p/Cdc50p dans les membranes C3.

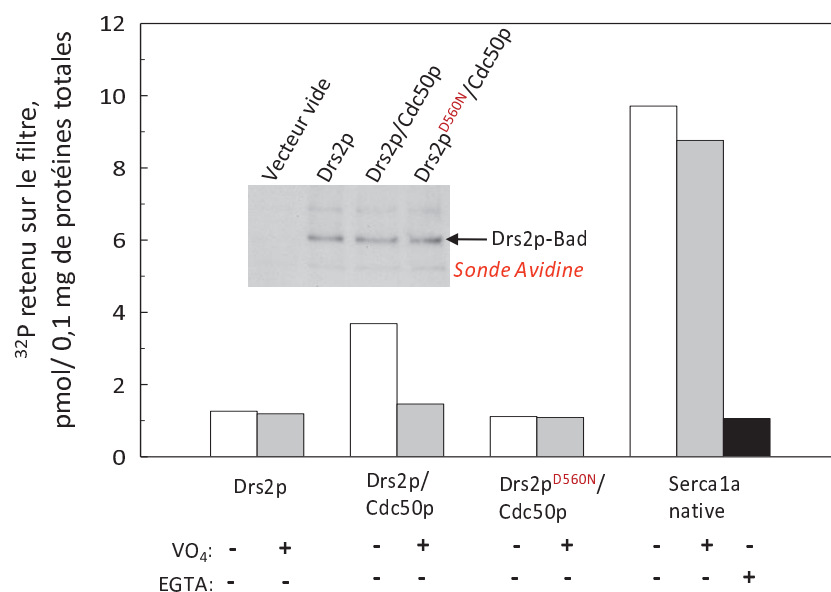


Figure 12. Dérivé phosphorylé formé par différents échantillons.

Des membranes C3 contenant soit Drs2p exprimé seul (mais en présence de Cdc50p endogène), soit Drs2p co-exprimé avec Cdc50p, soit Drs2p muté sur l'aspartate catalytique (Drs2p^{D560N}) et co-exprimé avec Cdc50p, ont été utilisées. Les membranes ont été préincubées dans la glace à 0,5 mg/mL de protéines totales dans 200 μ L de tampon A (100 mM KCl, 5 mM MgCl₂ et 50 mM Mops-Tris à pH 7) complété avec 100 μ M de CaCl₂ et en présence ou non de 1 mM de vanadate (VO₄). La phosphorylation a été initiée par l'ajout d'ATP radioactif [γ -³²P] à une concentration de 2 μ M. Les réactions ont été arrêtées au bout de 30 secondes par précipitation à l'acide (500 mM TCA supplémenté de 30 mM H₃PO₄) puis les échantillons ont été filtrés. Pour le western-blot, 0,25 μ g de protéines totales a été déposé sur SDS-PAGE. Drs2p-Bad a été détectée à l'aide d'une sonde avidine.

Afin de tester l'hypothèse de la formation d'un complexe Drs2p/Cdc50p, les membranes C3 issues de la co-expression de Drs2p avec Cdc50p ont été solubilisées en présence de n-Dodecyl- β -D-Maltoside (DDM). La fraction solubilisée a ensuite été incubée avec de la résine Ni²⁺-NTA afin d'immobiliser Cdc50p sur la résine (Cdc50p est étiquetée par 10 histidines en C-terminal). Le résultat de cette expérience montre que Cdc50p se fixe bien à la résine Ni²⁺-NTA, comme en témoigne la diminution significative de la quantité de Cdc50p dans la fraction non retenue par la résine (comparer les puits « S » et « NR », Fig. 13). L'intérêt majeur de cette expérience réside cependant dans le fait que Drs2p, elle aussi, se fixe à la résine Ni²⁺-NTA, très probablement grâce à son

interaction avec Cdc50p. De plus, ces deux protéines sont co-éluées par ajout d'imidazole (EI). Ces résultats indiquent que Drs2p et Cdc50p sont en interaction après solubilisation et qu'elles forment donc très probablement un complexe dans les membranes C3 avant même la solubilisation.

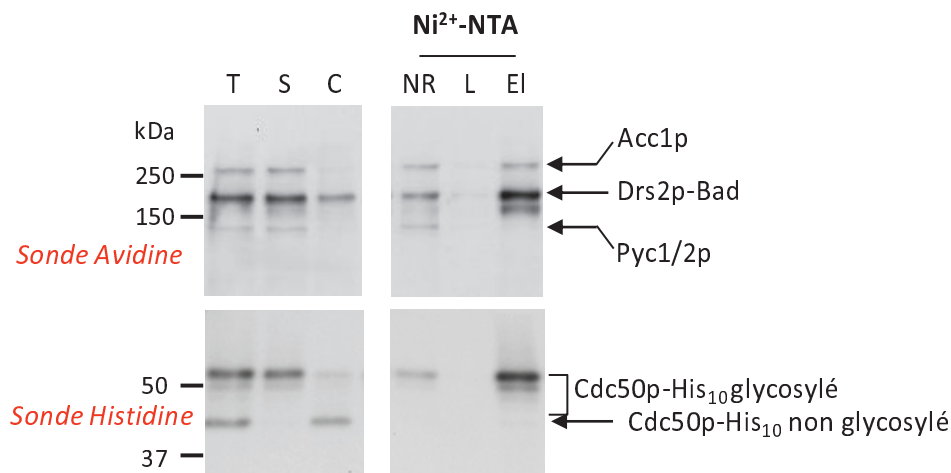


Figure 13. Cdc50p interagit physiquement avec Drs2p après solubilisation des membranes C3 par le DDM.

Les membranes C3, issues de la co-expression de Drs2p avec Cdc50p étiquetée en C-terminal avec 10 histidines, ont été solubilisées par le DDM à un ratio détergent/protéines totales de 1 g/g, dans du tampon de solubilisation SB (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 300 mM NaCl, 20% (w/v) glycérol et 5 mM $MgCl_2$) supplémenté avec 1 mM de PMSF et un cocktail d'inhibiteurs de protéases. Le surnageant (S) a été mis en contact avec la résine Ni^{2+} -NTA pendant la nuit, pour permettre la fixation de Cdc50p. Les protéines non fixées ont été récupérées dans le non retenu (NR) et la résine a été lavée (L) avec du tampon SB contenant 0,2 mg/mL de DDM. L'éluion a été effectuée par addition de 3 volumes de résine de tampon SB supplémenté de 0,2 mg/mL de DDM et de 250 mM d'imidazole (EI). 0,8 μ g de protéines totales de la fraction T a été déposé sur SDS-PAGE ainsi qu'un volume identique des autres fractions. Acc1p : acétyl-CoA carboxylase ; Pyc1/2p : pyruvate carboxylase, isoformes 1 et 2. Les protéines biotinylées ont été détectées à l'aide d'une sonde avidine et Cdc50p-His₁₀ par une sonde histidine.

c) La glycosylation de Cdc50p n'est pas requise pour la phosphorylation de Drs2p

Afin d'évaluer si les N-glycosylations de Cdc50p affectent le cycle catalytique de Drs2p, la formation de dérivé phosphorylé a été mesurée après déglycosylation de Cdc50p par la PNGase F (Fig. 14). Pour ces mesures nous avons dû modifier le protocole standard de déglycosylation par la PNGase F, car ce dernier inclut, avant déglycosylation, une incubation des échantillons avec le détergent NP-40, un détergent qui provoque, comme on le verra plus loin (Fig. 20), une diminution de la formation du dérivé phosphorylé à l'état stationnaire pour Drs2p. La présence de détergent étant néanmoins *a priori* utile pour que la PNGase F ait accès aux sites de glycosylation, le compromis que nous avons adopté a été d'utiliser le DDM. En absence de PNGase F, le DDM n'induit qu'une inactivation partielle de Drs2p à 37°C, mais permet en revanche une déglycosylation quasi-totale de Cdc50p en présence de PNGase F (voir western-blot de la Figure 14). L'action de la PNGase F fait apparaître de nouvelles bandes qui représentent très probablement des versions de Cdc50p avec 1, 2, 3 ou 4 sites glycosylés (Cdc50p possède 4 sites potentiels (Asn-X-Ser/Thr) de glycosylation), et aussi une augmentation de l'intensité de la version non glycosylée de Cdc50p (Fig. 14). La simple

incubation avec la PNGase F pendant 15 minutes, dans la glace, conduit à la disparition de la version de Cdc50p complètement glycosylée, sans pour autant qu'il y ait un effet sur la formation de dérivé phosphorylé. Ceci indique que la phosphorylation par l'ATP de Drs2p ne requiert pas la présence d'une version complètement glycosylée de la sous-unité Cdc50p. Comme on peut le voir sur la Figure 14, la seule incubation à 37°C, en absence de PNGase F, entraîne une inactivation irréversible de Drs2p. Cette inactivation est ralentie en présence de PNGase F, pour des raisons qui restent à élucider.

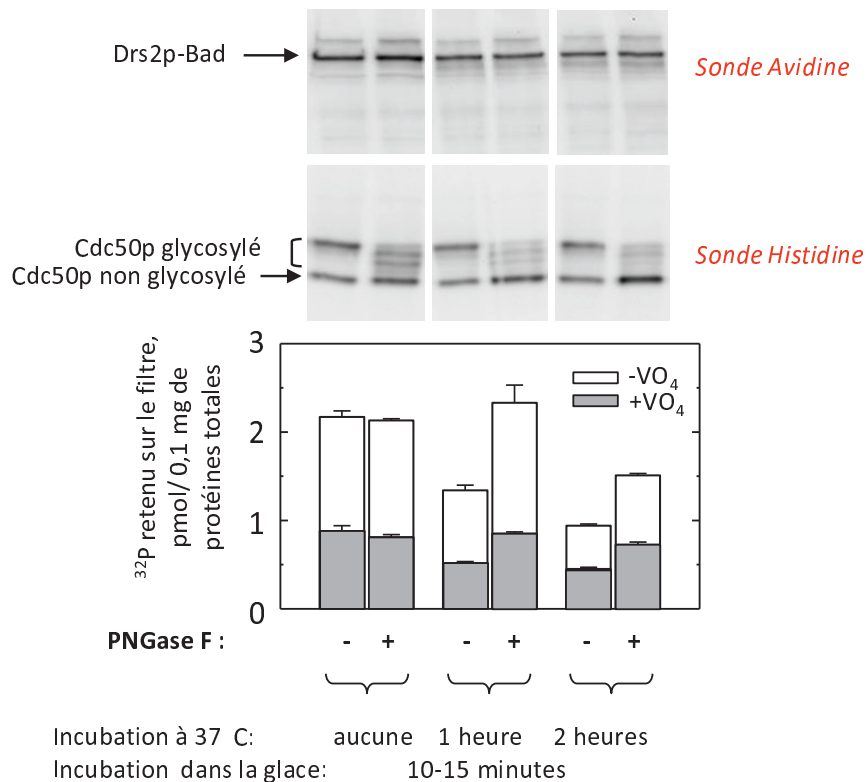


Figure 14. La déglycosylation de Cdc50p, après formation du complexe Drs2p/Cdc50p, n'empêche pas la formation de dérivé phosphorylé par le $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP.

Les membranes C3, contenant Drs2p co-exprimé avec Cdc50p, ont été utilisées. Les membranes C3 ont été diluées à 2 mg/mL dans le tampon de solubilisation SB (10 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 300 mM NaCl ; 20% (w/v) glycérol ; 5 mM MgCl₂) qui contient 1 mg/mL de DDM. Ces membranes ont été incubées 0, 1 heure ou 2 heures à 37°C avant d'être incubées dans la glace pendant 15 minutes, en absence ou en présence de 10 µg/mL de PNGase F (i.e 20,000 U/ml). Les membranes ont ensuite été diluées à 0,5 mg/mL dans le tampon A (100 mM KCl, 5 mM MgCl₂ et 50 mM Mops-Tris à pH 7) supplémenté de 0,1 mM de CaCl₂ et 1 mM d'EGTA. Les mesures du dérivé phosphorylé de ces échantillons ont été réalisées par filtration. La phosphorylation a été initiée par l'ajout de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP à 0,5 µM, en présence ou en absence de 1 mM de vanadate (VO₄). 1,5 µg de protéines totales a été déposé sur SDS-PAGE. Drs2p-Bad a été détectée à l'aide d'une sonde avidine et Cdc50p-His₁₀ par la sonde histidine.

d) Optimisation des conditions de phosphorylation de Drs2p

Nous avons ensuite essayé d'optimiser les conditions de mesure du dérivé phosphorylé à l'état stationnaire, en utilisant les membranes C3 contenant Drs2p et Cdc50p. Nous avons commencé par

réaliser des cinétiques de phosphorylation à différentes températures et concentrations en ATP radioactif, et ce en présence ou en absence de vanadate. La Figure 15 indique que le dérivé phosphorylé atteint rapidement l'état stationnaire, en moins de 30 secondes, à 4°C ou à 24°C (panneaux A et B). La décroissance du dérivé phosphorylé après ces 30 secondes, particulièrement prononcée à 24°C, reflète la disparition de l'ATP du fait de son utilisation par les autres ATPases présentes dans les membranes C3. Pour contrôle, la cinétique de phosphorylation du mutant inactif Drs2p^{D560N} confirme qu'il y a peu de protéines, autres que Drs2p, sensibles au vanadate dans les membranes C3 (panneau D). À ce stade, il semble plus facilement reproductible d'effectuer les réactions de phosphorylation à 4°C qu'à 24°C. Une optimisation supplémentaire a consisté à tester l'effet de concentrations plus faibles d'ATP radioactif. Le résultat de cette expérience est présenté sur le panneau C de la Figure 15. À 0,5 µM d'ATP radioactif, la phosphorylation reste rapide, et aux temps courts (~30 s) la composante vanadate-insensible du dérivé phosphorylé diminue dans une plus large mesure que la composante vanadate-sensible, ce qui permet d'obtenir un meilleur rapport signal/bruit à l'état stationnaire. Dans les expériences suivantes, une concentration d'ATP radioactif de 0,5 µM et une température de 4°C ont donc été choisies comme conditions de phosphorylation.

L'étude, en parallèle, de la cinétique de phosphorylation de Serca1a en présence de vanadate montre, comme attendu, que la formation de dérivé phosphorylé pour Serca1a dépend de la présence ou de l'absence de calcium au moment où on ajoute le vanadate (panneaux E et F). En effet, il est connu que la forme E1 de Serca1a, liée au calcium, ne se lie pas au vanadate, alors que la forme E2, sans calcium, se lie au vanadate (Pick, 1982). Ceci nous amène à penser, du fait de l'efficacité de l'inhibition de Drs2p par la vanadate, que Drs2p contenue dans les membranes C3, en absence d'ATP, est principalement sous une conformation de type E2.

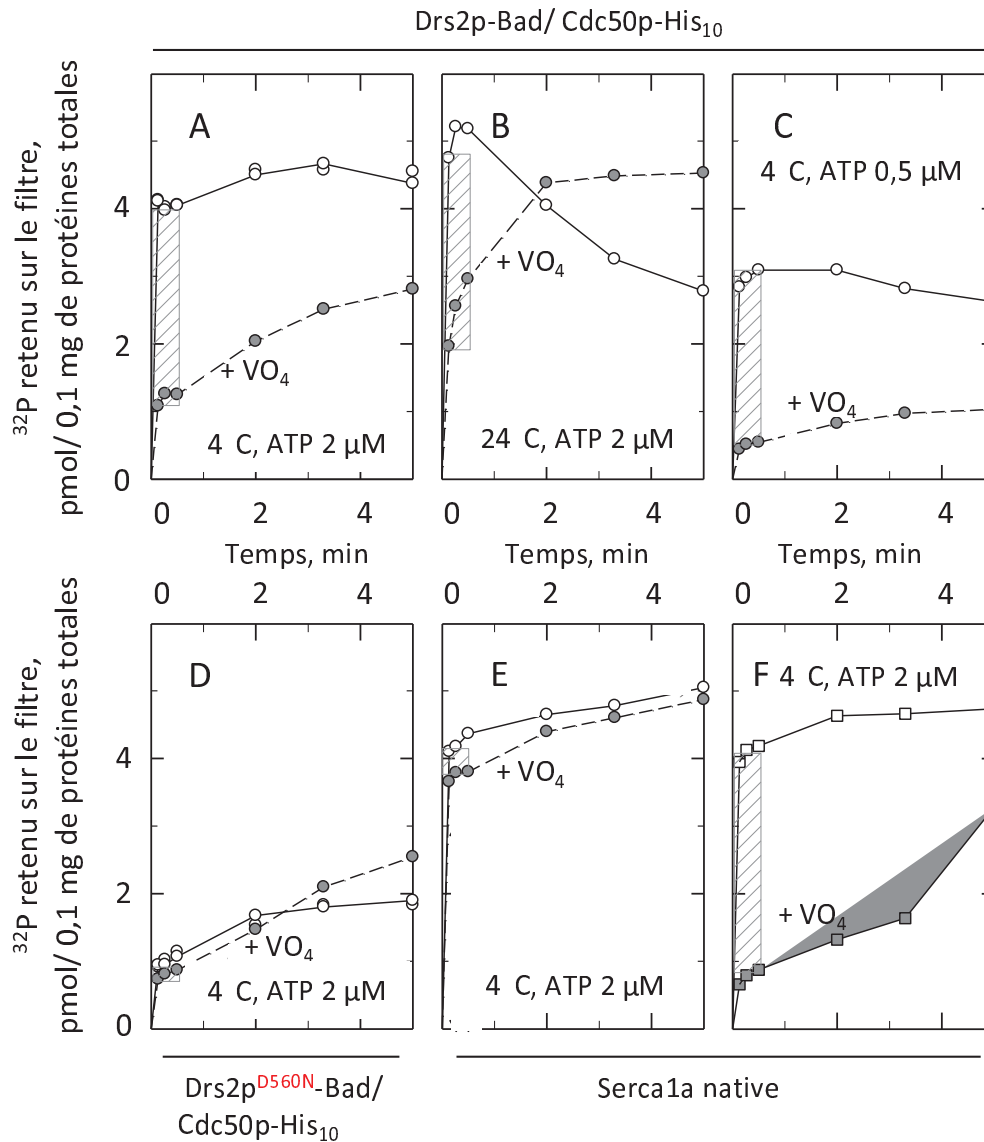


Figure 15. Cinétique de phosphorylation du complexe Drs2p/Cdc50p.

Les membranes C3 contenant Drs2p co-exprimé avec Cdc50p (panneaux **A**, **B** et **C**) ou Drs2p^{D560N} co-exprimé avec Cdc50p (panneau **D**) ont été utilisées. Pour contrôle, des membranes de levures transformées par le vecteur vide, auxquelles on a ajouté des membranes du réticulum sarcoplasmique, ont aussi été testées (5 μg/ml de protéines du réticulum sarcoplasmique pour 0,5 mg/ml de protéines totales, soit ~1% des protéines totales, panneau **E** et **F**). Les membranes ont été préincubées pendant 5 minutes à 0,5 mg/mL de protéines totales dans 200 μL de tampon A (100 mM KCl, 5 mM MgCl₂ et 50 mM Mops-Tris à pH 7) complété avec 100 μM de CaCl₂, dans la glace ou à 24°C et en présence (symboles gris) ou en absence (symboles blancs) de 1 mM de vanadate (VO₄). Pour le panneau **F**, 0,2 mM d'EGTA a aussi été ajouté. La phosphorylation a été initiée par l'ajout d'ATP radioactif [γ-³²P] à une concentration de 2 μM ou de 0,5 μM. Les réactions ont été arrêtées après différents temps par précipitation à l'acide (500 mM TCA supplémenté de 30 mM H₃PO₄) puis les échantillons ont été filtrés.

La plupart des ATPases de type P décrites jusqu'ici nécessitent la fixation d'un ion dans les sites membranaires de haute affinité pour que la phosphorylation soit possible. Pour évaluer la possible contribution des ions dans la phosphorylation de l'ATPase P4 Drs2p, nous avons étudié l'effet des conditions ioniques sur la formation de dérivé phosphorylé à l'état stationnaire (Fig. 16). Comme on peut le voir, des variations du pH ou de la concentration en KCl n'ont que peu d'effet sur la formation du dérivé phosphorylé à l'état stationnaire (panneaux A et B). Il en va de même pour le NaCl (panneau C). La formation de dérivé phosphorylé est également insensible à la concentration en Ca^{2+} (panneau C). L'ajout d'EDTA, un chélateur des ions divalents comme le magnésium, provoque une forte diminution de la formation de dérivé phosphorylé à l'état stationnaire, probablement parce que c'est bien le Mg^{2+} -ATP qui est le substrat de Drs2p, comme pour les ATPases de type P étudiées jusqu'ici (panneau C). Le cobalt, le lanthane (connus pour pouvoir se substituer au magnésium pour la phosphorylation des ATPases de type P) et le CCCP (carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone, un protonophore décrit comme bloquant le flip des phospholipides fluorescent NBD-PC, NBD-PS et NBD-PE dans la membrane plasmique de levures (Stevens and Nichols, 2007)) n'affecte pas très significativement la mesure du dérivé phosphorylé à l'état stationnaire (panneau C). De la même manière, les anions sulfate, oxalate et arsenate, à 2 mM, n'ont pas beaucoup d'effet sur la mesure du dérivé phosphorylé à l'état stationnaire (panneau C). Le zinc, dont une concentration trop élevée inhibe la croissance des levures *Δ drs2* (Pomorski et al., 2003), semble inhiber légèrement, à forte concentration, la formation de dérivé phosphorylé.

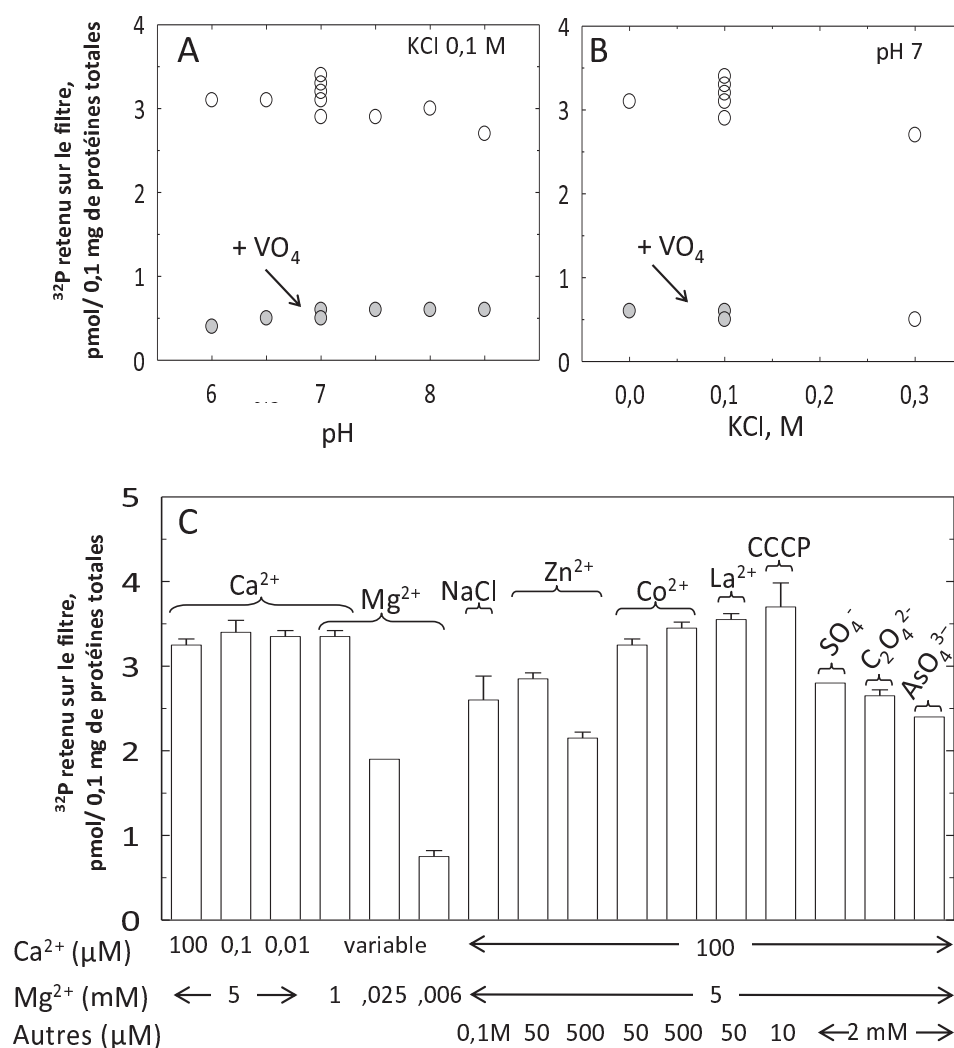


Figure 16. Effet des conditions ioniques sur la phosphorylation de Drs2p par le $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$.

Les membranes C3 contenant Drs2p co-exprimé avec Cdc50p ont été utilisées. Les membranes ont été préincubées dans la glace à 0,5 mg/mL de protéines totales dans 200 μL de tampon (100 mM KCl en général, 5 mM MgCl_2 et 50 mM Mops-Tris à pH 7 en général) complété avec 100 μM de CaCl_2 . **A** et **B**. l'effet du pH et du KCl ont été mesurés en présence (cercle gris) ou en absence (cercle blanc) de 1 mM de vanadate. **C**. Effet de différentes additions : 0,6 ou 5 mM d'EGTA ont été ajoutés pour réduire la concentration en Ca^{2+} libre à 0,1 ou 0,01 μM , ou bien 4, 7,5 ou 15 mM d'EDTA ont été ajoutés pour réduire la concentration en Mg^{2+} (et simultanément en Ca^{2+}), ou bien 0,1 M de NaCl, 50 ou 500 μM de zinc ou de cobalt ont été ajoutés, ou bien 50 μM de LaCl_3 ou 10 μM de CCCP ont été ajoutés, ou bien 2 mM de sulfate (SO_4^{2-}), d'oxalate ($\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$) ou d'arsenate (AsO_4^{3-}) ont été ajoutés. La phosphorylation a été initiée par l'ajout d'ATP radioactif $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ à une concentration de 0,5 μM . Les réactions ont été arrêtées après 30 secondes dans la glace par précipitation à l'acide (500 mM TCA supplémenté de 30 mM H_3PO_4) puis les échantillons ont été filtrés. VO_4 : vanadate.

e) Inhibiteurs de la phosphorylation de Drs2p : vanadate et fluorures

L'effet d'inhibiteurs connus d'ATPases de type P (Daiho et al., 1993; Hobbs et al., 1980; Kubota et al., 1993; Murphy and Coll, 1992a; Murphy and Coll, 1992b; Murphy and Coll, 1993; Pick, 1982; Troullier et al., 1992; Yamasaki et al., 2002) sur la formation du dérivé phosphorylé à l'état stationnaire a aussi été testé (Fig. 17). Nous avons commencé par caractériser plus précisément l'effet inhibiteur du vanadate. L'affinité apparente du complexe Drs2p/Cdc50p pour le vanadate, à 4°C ou 24°C, est de l'ordre de 1 μ M (panneau A) et à 0,1 mM l'inhibition maximale est atteinte en 1 minute (panneau C, cercle gris). Cette rapidité d'action, et la capacité du vanadate à totalement inhiber la formation de dérivé phosphorylé par Drs2p, suggère que Drs2p est plutôt dans une conformation de type « E2 » dans les membranes C3. En effet, le vanadate se lie spécifiquement à la forme « E2 » des ATPases de type P (Pick, 1982).

Nous avons également testé l'effet de composés fluorés connus pour inhiber certaines ATPases de type P. Comme le montre le panneau B de la Figure 17, Drs2p est inhibée par 1 mM de fluorure, lorsque celui-ci est combiné avec 50 μ M d'aluminium (triangles) ou de béryllium (carré), et ce à 4°C ou à 24°C (symboles blancs ou gris, respectivement). Même à 4°C, cette inhibition est rapide (inhibition maximum atteinte en 1 minute) dans le cas du béryllium (panneau C, carrés gris) et seulement légèrement plus lente (inhibition maximum atteinte en 5 minutes) dans le cas de l'aluminium (panneau C, triangles gris). Le fluor seul (mais en présence du Mg^{2+} contenu dans le tampon), quant à lui, exerce une très lente inhibition (panneaux C, losanges gris). Ces cinétiques sont similaires à celles déjà obtenues pour l'inhibition de Serca1a par les composés fluorés (Picard et al., 2006b). L'aluminium et le béryllium seuls ont très peu d'effet sur la formation de dérivé phosphorylé à l'état stationnaire (panneau B, triangles et carrés blancs, respectivement). Il faut noter que pour une raison inconnue, l'incubation des membranes C3 diluées dans le tampon A avec de l'aluminium seul ($AlCl_3$) entraîne une augmentation de la formation de dérivé phosphorylé, observée également avec le mutant inactif D560N (Fig. 18A).

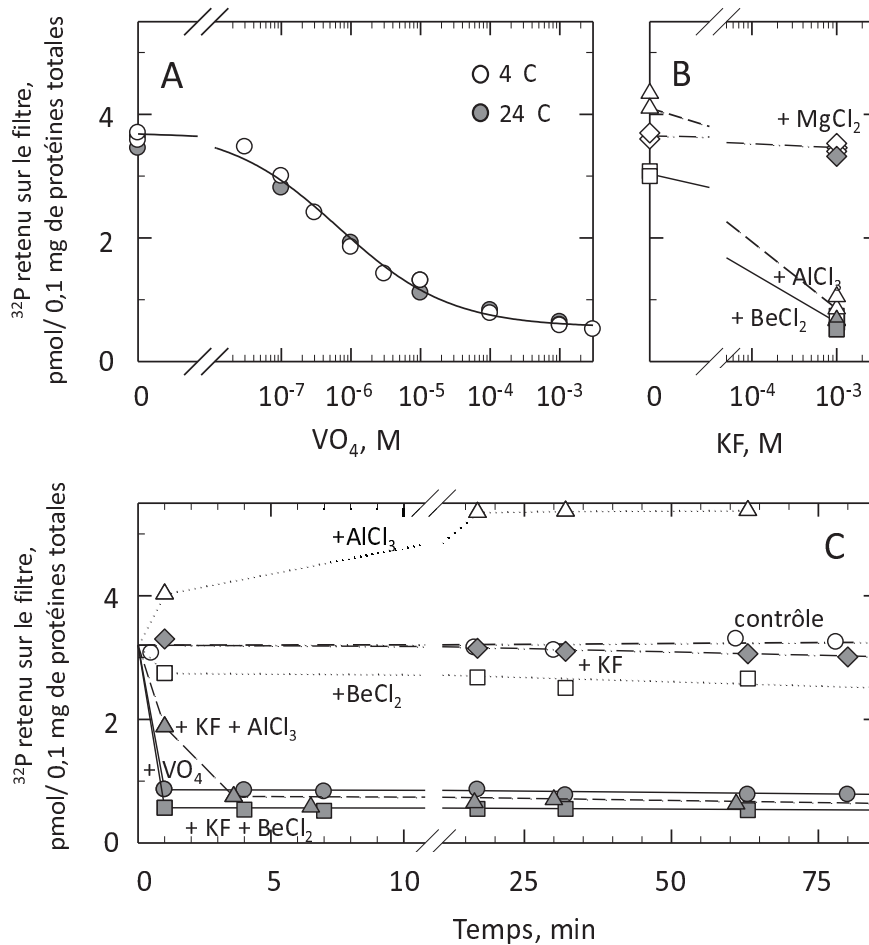


Figure 17. Inhibition de la phosphorylation de Drs2p par le vadanate et les composés fluorés.

Les membranes C3 contenant Drs2p co-exprimée avec Cdc50p ont été utilisées. Les membranes ont été diluées dans la glace à 0,5 mg/mL de protéines totales, dans 200 μ L de tampon A (100 mM KCl, 5 mM MgCl_2 et 50 mM Mops-Tris à pH 7) additionné de 100 μ M de CaCl_2 . La phosphorylation a été initiée par ajout d'ATP radioactif [γ - ^{32}P] à une concentration de 0,5 μ M. Les réactions ont été arrêtées après 30 secondes dans la glace, par précipitation à l'acide (500 mM TCA supplémenté de 30 mM H_3PO_4) puis les échantillons ont été filtrés. **A.** et **B.** Les incubations à différentes concentration d'inhibiteurs ont duré 1 heure à 24°C (symboles blancs) ou dans la glace (symboles gris), et ont été suivies d'une incubation supplémentaire dans la glace de 20 à 40 minutes dans tous les cas. **B.** Les incubations ont eu lieu en absence ou en présence de 1 mM de KF et de 50 μ M de BeCl_2 (carrés) ou de 50 μ M d' AlCl_3 (triangles) ou encore en présence de MgCl_2 seul (losanges). **C.** Cinétique d'inhibition, dans la glace, par 0,1 mM de vanadate (VO_4 ; cercles gris), ou par 50 μ M de BeCl_2 en absence (carrés blanc) ou en présence de (carrés gris) de 1 mM de KF, ou par 50 μ M d' AlCl_3 en absence (triangles blanc) ou en présence de (triangles gris) de 1 mM de KF, ou encore par 1 mM de KF (losanges gris). Une incubation contrôle, en absence d'inhibiteurs, est représentée par les cercles blancs.

Nous avons ensuite cherché à caractériser plus en détail l'inhibition de Drs2p par le fluorure d'aluminium. Comme on peut le voir sur le panneau A de la Figure 18, en présence de 1 mM de KF (symboles gris) et à pH 7, l'inhibition est complète en présence de 5 μ M d' AlCl_3 (cercle gris), mais l'efficacité de l'inhibition diminue fortement à pH 8 (panneau B, carré gris). L'effet du pH est compréhensible si on imagine que comme pour d'autres systèmes (y compris Serca1a) c'est AlF_4^- qui est l'espèce inhibitrice et qu'un pH alcalin diminue le ratio $\text{AlF}_4^-/\text{Al}(\text{OH})_4^-$, $\text{Al}(\text{OH})_4^-$ n'étant

apparemment pas inhibiteur. Pour contrôle, le mutant inactif Drs2p^{D560N} n'est que peu sensible à la présence de fluorure d'aluminium (triangles blancs et gris, panneau A). À pH 7, l'inhibition par le fluorure d'aluminium peut aussi être minimisée par l'utilisation d'un chélateur d'aluminium, l'EGTA (triangles inversés gris) ou la desferrioxamine B (un chélateur de fer et d'aluminium, losanges gris) (panneau C). De façon intéressante, l'inhibition par le fluorure d'aluminium peut être reversée (panneau D ; carrés, losanges et triangles gris) par l'utilisation de ces chélateurs, ou encore grâce à une augmentation du pH.

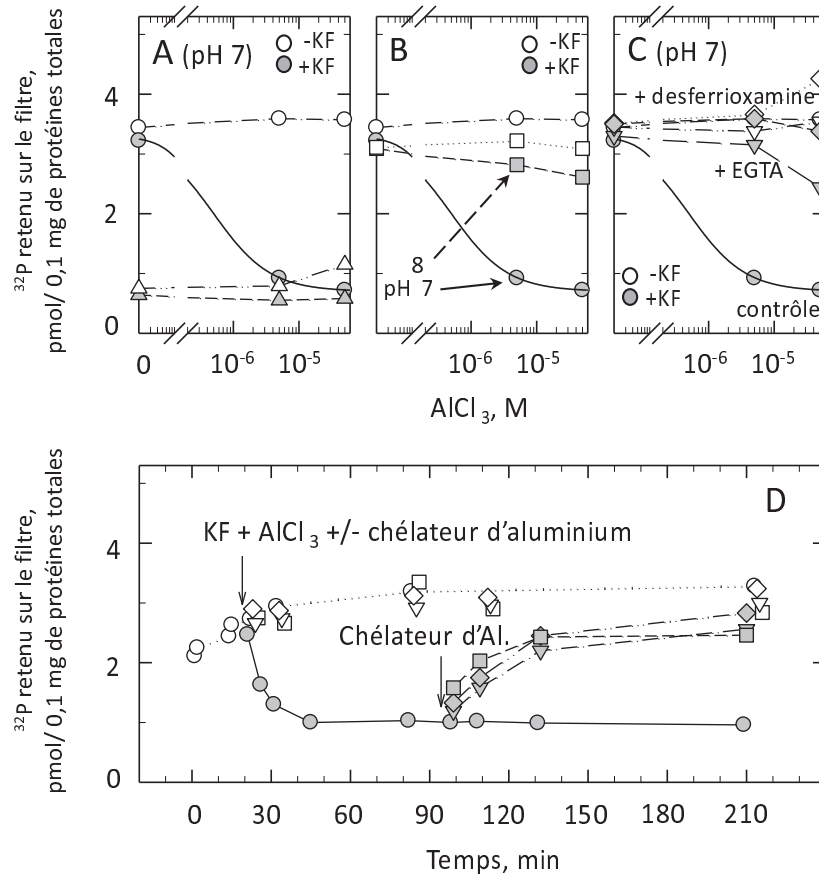


Figure 18. Inhibition de la phosphorylation de Drs2p par le fluorure d'aluminium.

A, B et C. Les membranes C3 contenant Drs2p co-exprimée avec Cdc50p ont été utilisées (pour le panneau A, des membranes C3 contenant Drs2p^{D560N} co-exprimée avec Cdc50p ont aussi été utilisées (triangles)). Les membranes ont été diluées dans la glace, à 0,5 mg/mL de protéines totales dans 200 µL de tampon constitué de 50 mM Mops-Tris (à pH 7 pour les panneaux A et C, et à pH 7 (cercles) ou 8 (carrés) pour le panneau B), 100 mM KCl, 5 mM Mg²⁺ et 100 µM Ca²⁺ ont été ajoutés. Pour le panneau C, 5 mM EGTA (triangles inversés) ou 150 µM de desferrioxamine B (losanges) ont été ajoutés. Pour les panneaux A à C, l'incubation a duré ~3 heures dans la glace en présence de concentrations variables d'AlCl₃, et en absence (symboles blancs) ou en présence (symboles gris) de 1 mM de KF. La phosphorylation a été initiée par ajout d'ATP radioactif [γ -³²P] à une concentration de 0,5 µM. Les réactions ont été arrêtées après 30 secondes dans la glace, par précipitation à l'acide (500 mM TCA supplémenté de 30 mM H₃PO₄) puis les échantillons ont été filtrés. **D.** Les membranes ont été incubées dans la glace, à 0,5 mg/mL de protéines totales dans 200 µL de tampon A (50 mM Mops-Tris à pH 7, 100 mM KCl, 5 mM Mg²⁺ et 100 µM Ca²⁺), sans inhibiteur, à partir de t= 0 (cercles blancs), puis 50 µM d'AlCl₃ et 1 mM de KF ont été ajoutés à t= 20 minutes (cercles gris). À t= 95 minutes, les chélateurs de l'aluminium ont été ajoutés à l'échantillon inhibé par le fluorure d'aluminium. Ces inhibiteurs sont soit du Tris, pour augmenter le pH à 8 (carrés gris), soit 10 mM d'EGTA (triangles gris) ou encore 0,2 mM de desferrioxamine (losanges gris).

Pour contrôle, ces trois chélateurs ont également été ajoutés avec l'aluminium et le fluor à t= 20 minutes (carrés, triangles et losanges blancs). Une expérience contrôle, en absence d'inhibiteurs, est représentée par les cercles blancs.

f) Solubilisation du complexe Drs2p/Cdc50p par les détergents et conséquences fonctionnelles

En vue de purifier le complexe Drs2p/Cdc50p, nous avons testé la capacité de certains détergents à solubiliser Drs2p et Cdc50p, ainsi que leurs capacités à préserver la phosphorylation du complexe.

- *Solubilisation des protéines Drs2p et Cdc50p*

Nous avons commencé par évaluer la capacité de certains détergents à solubiliser Drs2p et Cdc50p. Dans l'expérience particulière montrée sur la Figure 19A pour les détergents à basse CMC, le DDM permet de solubiliser la majeure partie de Drs2p et de Cdc50p glycosylée, et ce pour un ratio détergent/protéines relativement faible (0,5 g/g ; comparer « T » pour fraction totale à « S » pour fraction solubilisée et « C » pour fraction non solubilisée sur le western-blot de la Figure 19A). Pour obtenir une solubilisation similaire avec le C₁₂E₈, le Triton X-100 ou la L- α -lysophosphatidylcholine (LPC), il est nécessaire de se placer à un ratio détergent/protéines de 2,5 g/g. Les détergents à haute CMC comme l'Hecameg, le CHAPS et l'octyl-glucoside se sont également révélés être efficaces pour la solubilisation de Drs2p et Cdc50p (Fig. 19B), même si dans ce cas, il est nécessaire, comme on pouvait s'y attendre, d'utiliser des ratios détergent/protéines plus élevés. Dans tous les cas, les versions glycosylées de Cdc50p sont solubilisées dans des proportions analogues à Drs2p tandis que la version non glycosylée de Cdc50p ne l'est pas. Il est possible que la forme non glycosylée de Cdc50p ne soit pas bien repliée, voire agrégée, et que cela prévienne sa solubilisation par les différents détergents testés, ou encore simplement que les glycosylations contribuent à rendre la protéine plus hydrophile.

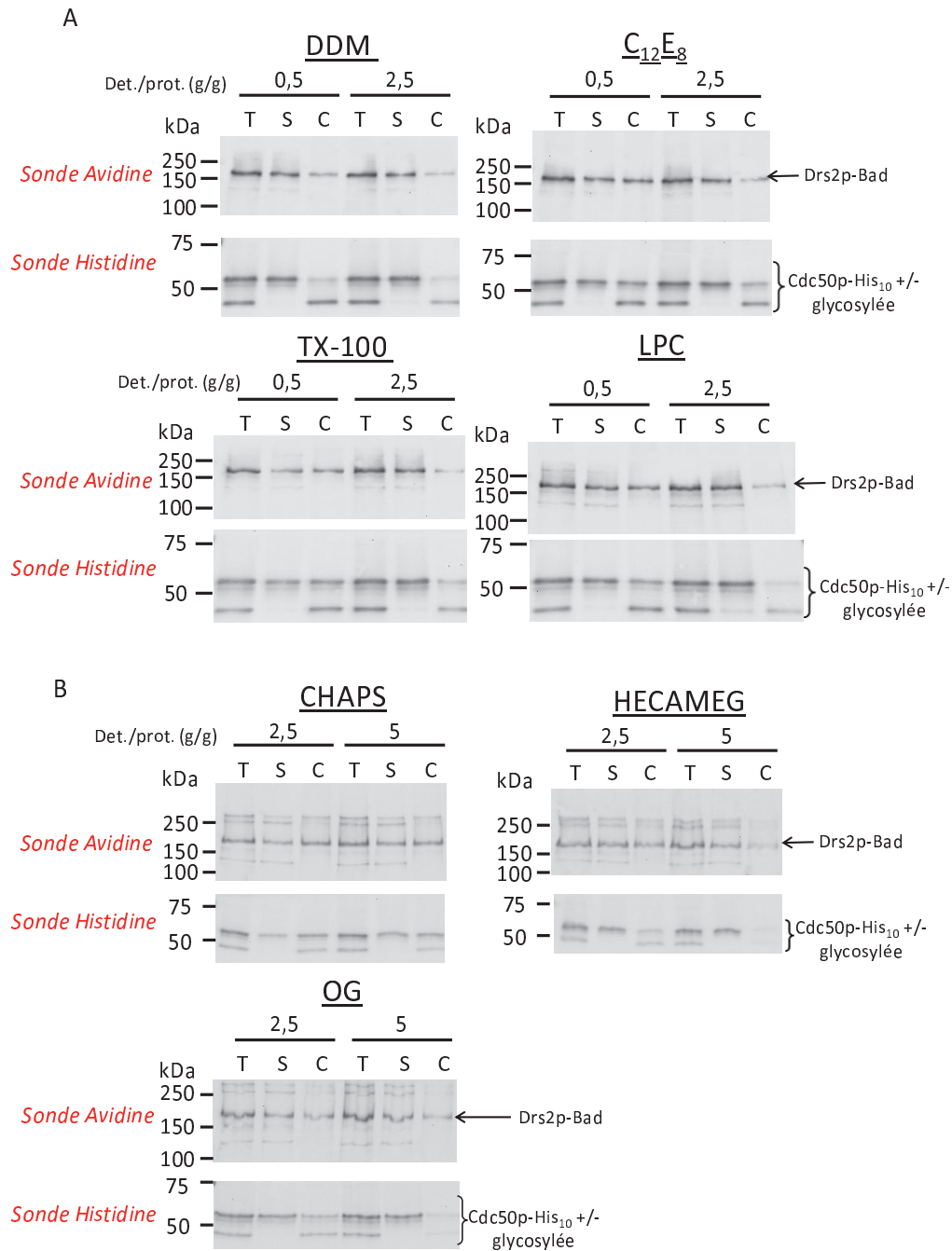


Figure 19. Solubilisation de Drs2p et Cdc50p.

Les membranes C3 ont été diluées à 2 mg/mL de protéines totales dans le tampon de solubilisation SB (10 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 300 mM NaCl ; 20% (p/v) glycérol ; 5 mM MgCl₂) supplémenté avec 1 mM de PMSF et 1X d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases. Le détergent a alors été ajouté aux membranes à un ratio détergent/protéines totales (p/p) variable et le mélange a été incubé 1 heure, à 4°C, sur une roue. Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 88000 g_{av} pendant 1 heure à 4°C. La partie insoluble de l'échantillon a été collectée dans le culot et la partie soluble dans le surnageant. Pour l'analyse des échantillons par western-blot, le culot a été repris avec un volume de tampon SB équivalent au volume du surnageant. T : fraction membranaire totale. S : fraction solubilisée. C : fraction insoluble. 0,5 µg des fractions T a été déposé sur SDS-PAGE ainsi qu'un volume équivalent des fractions S et C. La détection de Drs2p-Bad a été effectuée à l'aide d'une sonde avidine alors que la détection de Cdc50p-His₁₀ a été faite à l'aide d'une sonde histidine.

- *Conséquences fonctionnelles immédiates de la solubilisation du complexe Drs2p/Cdc50p, et inactivation ultérieure en fonction du temps*

Nous nous sommes intéressés ensuite à l'effet des détergents sur la fonction de Drs2p, en mesurant en présence de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ la formation de dérivé phosphorylé après une incubation plus ou moins longue des membranes C3 avec ces détergents. En effet, la purification d'une protéine membranaire implique de longues périodes d'incubation de la protéine en présence de détergent, et notre premier souci a été d'identifier un détergent qui ne soit pas trop délétère pour l'activité du complexe. Dans un premier temps, l'effet d'une incubation courte (quelques minutes) des membranes C3 avec les détergents a été testé. Ce test a pour but d'identifier les détergents avec lesquels il est possible de former le dérivé phosphorylé, avant une éventuelle inactivation irréversible sur des temps plus longs. Dans cette optique, les membranes C3 issues de la co-expression de Drs2p sauvage ou de Drs2p^{D560N} avec Cdc50p ont été incubées avec différents détergents pendant 1 minute, à un ratio détergent/protéines totales de 10 g/g. En présence de DDM le niveau de phosphorylation du complexe Drs2p/Cdc50p à l'état stationnaire est légèrement supérieur à celui obtenu pour les membranes contrôle (Fig. 20, panneau A). Pour le C₁₂E₈ ou le CHAPS et le CHAPS en présence de lecithine d'œuf et de DTT (comme utilisé dans Coleman *et al.*, 2009 pour la purification d'ATP8A2), ce niveau n'est pas très différent (panneau A). De même pour l' α -DDM, les C12, C11 et C10- β -maltosides et le CYMAL-5 (panneau B). Pour le Triton X-100, la digitonine (déjà utilisée pour la purification du complexe Drs2p/Cdc50p (Lenoir *et al.*, 2009)) et la diC₇PC (lipide à chaînes d'acides gras courtes, utilisé pour d'autres protéines membranaires, (Hauser, 2000)), le niveau de phosphorylation à l'état stationnaire est par contre inférieur à celui observé pour les membranes contrôle (panneau A). La solubilisation par le NP-40 (détergent non-ionique), le DDAO, la LPC ou l'octylthiogluco-side entraîne aussi une diminution du niveau de phosphorylation à l'état stationnaire par rapport aux conditions contrôle (panneau B). Notons que la fraction insensible au vanadate du dérivé phosphorylé est, quant à elle, beaucoup moins sensible à l'ajout de ces détergents (symboles gris, Fig. 20A).

Dans un second temps, sachant que les détergents peuvent, en plus d'altérer le niveau de phosphorylation à l'état stationnaire, entraîner une inactivation irréversible progressive des protéines membranaires, nous avons, pour quelques uns d'entre eux, réalisé des mesures de dérivé phosphorylé après différents temps d'incubation avec ces détergents. Pour un ratio élevé détergent/protéines (10 g/g), le DDM s'avère significativement moins inactivateur que le C₁₂E₈ et le Triton X-100 (Fig. 20C). Le CHAPS, même en présence de lecithine d'œuf et de DTT, ne préserve pas non plus la stabilité de Drs2p (Fig. 20D). Ainsi, pour de longues périodes d'incubation, le DDM semble être le détergent le plus approprié. La fraction insensible au vanadate du dérivé phosphorylé est, quant à elle, beaucoup moins sensible à l'ajout de ces détergents (résultats non montrés).

Afin de limiter l'inactivation résiduelle par le DDM, nous avons ensuite essayé différents ratios DDM/protéines totales (Fig. 20E). L'utilisation de DDM à des ratios détergent/protéines plus modestes (2 g/g et 0,5 g/g) mais toujours aptes à solubiliser Drs2p et Cdc50p (Fig. 19) préserve totalement la capacité de Drs2p à se phosphoryler après une longue période d'incubation en détergent (plusieurs heures dans la glace).

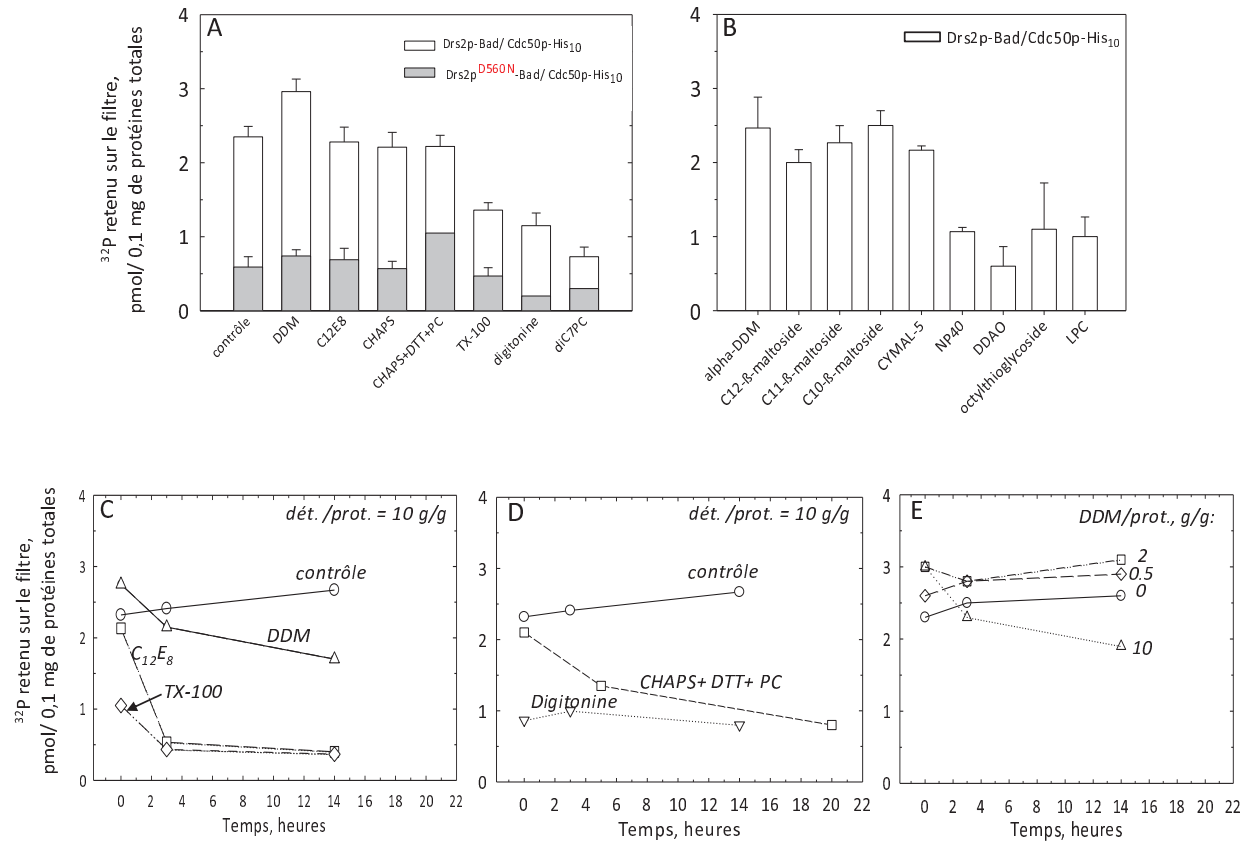


Figure 20. Effet des détergents sur le dérivé phosphorylé formé à l'état stationnaire, mesuré immédiatement après solubilisation ou bien après éventuelle inactivation au cours du temps.

Les membranes C3, issues de la co-expression de Drs2p (symboles blancs) ou Drs2p^{D560N} (symboles gris) avec Cdc50p, ont été diluées à 2 mg/mL de protéines totales dans le tampon de solubilisation SB (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 300 mM NaCl, 20% (w/v) glycérol et 5 mM MgCl₂) supplémenté avec 1 mM de PMSF et un cocktail d'inhibiteurs de protéases. **A et B**, Le détergent a été ajouté aux membranes à un ratio détergent/protéines totales de 10 g/g et le mélange a été incubé 1 minute à 4°C. Les échantillons ont ensuite été dilués à 0,5 mg/mL de protéines totales dans 200 µL de tampon A (100 mM KCl, 5 mM MgCl₂ et 50 mM Mops-Tris à pH 7) complété avec 100 µM de CaCl₂. La phosphorylation a été initiée, dans la glace, par ajout d'ATP radioactif [γ -³²P] à une concentration de 0,5 µM. Les réactions ont été arrêtées après 30 secondes par précipitation à l'acide (500 mM TCA supplémenté de 30 mM H₃PO₄) puis les échantillons ont été filtrés (mais cette fois sur deux filtres et après un temps d'agrégation suffisant pour que les protéines précipitées se fixent sur le premier filtre ; les comptages des deux filtres ont été additionnés). **C, D, et E**. Les mêmes mesures qu'en **A** ont été réalisées mais avec des temps d'incubation variables en présence de détergent. Det. : détergent. Prot. : protéines totales. **C**. Le DDM est représenté par les triangles, le C₁₂E₈ par les carrés et le Triton X-100 (TX-100) par les losanges. **D**. La digitonine est représentée par des triangles inversés et le CHAPS auquel on a ajouté du DTT (1 mM) et de la lécithine d'œufs (1g/g de protéines) est représenté par les carrés. **E**. Le DDM a été testé à différents ratios détergent/protéines totales.

g) Cinétique de déphosphorylation de Drs2p

Bien qu'il soit déjà très positif d'être en mesure de détecter la formation de dérivé phosphorylé par l'ATP, cela ne préjuge pas pour autant de la capacité de Drs2p à effectuer un cycle catalytique complet. En effet, dans les travaux précédemment publiés, le dérivé phosphorylé formé n'était pas capable de se déphosphoryler, que ce soit pour le complexe Drs2p/Cdc50p purifié après expression en levure (Lenoir et al., 2009) ou pour le complexe ATP8B1/CDC50A purifié après expression en cellules d'insectes *Sf9* (Bryde et al., 2010). Afin de déterminer si la protéine Drs2p exprimée dans ce travail est capable ou non de réaliser un cycle catalytique complet, nous avons donc mesuré des cinétiques de déphosphorylation. Pour cela, Drs2p a été phosphorylée par le $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ jusqu'à atteindre l'état stationnaire, et la déphosphorylation a été déclenchée par un protocole classique de « chasse », par addition d'un large excès d'ATP non radioactif.

Lorsque cette expérience est réalisée sur des membranes C3 issues de la co-expression de Drs2p et Cdc50p, on voit que, à 4°C, une large partie de l'échantillon résiste à la chasse par l'ATP non radioactif (carrés, Fig. 21A), et est insensible à l'ADP (triangles, Fig. 21A). Cependant, la déphosphorylation est bien sensible à la température, comme on l'attend d'un processus enzymatique, puisqu'elle est plus rapide à 37°C qu'à 4°C (cercles, Fig. 21A). La cinétique de déphosphorylation est apparemment composée de deux phases : une rapide et une lente. La phase rapide intervient dans les 20 premières secondes de déphosphorylation, alors que le temps nécessaire à la disparition de la moitié du composant lent ($t_{1/2}$) est de 1 à 2 minutes à 37°C. La cinétique de déphosphorylation du mutant Drs2p^{D560N} (Fig. 21B), indique qu'une partie de la phase rapide est attribuable aux autres protéines phosphorylables des membranes C3, tandis que la quasi-totalité de la composante lente correspond à la déphosphorylation de Drs2p. Pour contrôle, une cinétique de déphosphorylation a aussi été réalisée pour la protéine Serca1a native et, comme attendu, cette cinétique est beaucoup plus rapide puisque Serca1a est complètement déphosphorylée au bout de 30 secondes à 4°C (panneau D).

Cette expérience a aussi été réalisée sur des membranes C3 solubilisées (Fig. 21C). Il apparaît que la présence de DDM (cercles) affecte peu la cinétique de déphosphorylation à 37°C (comparer avec la cinétique en membrane du panneau A), contrairement à la situation observée après solubilisation par le C_{12}E_8 (triangles) et la diC_7PC (carrés), qui accélèrent tous deux significativement la déphosphorylation. Ainsi, le complexe Drs2p/Cdc50p exprimé dans les membranes C3 est capable d'effectuer un cycle catalytique complet, même si les cinétiques de déphosphorylation sont relativement lentes, en membrane ou après solubilisation par le DDM.

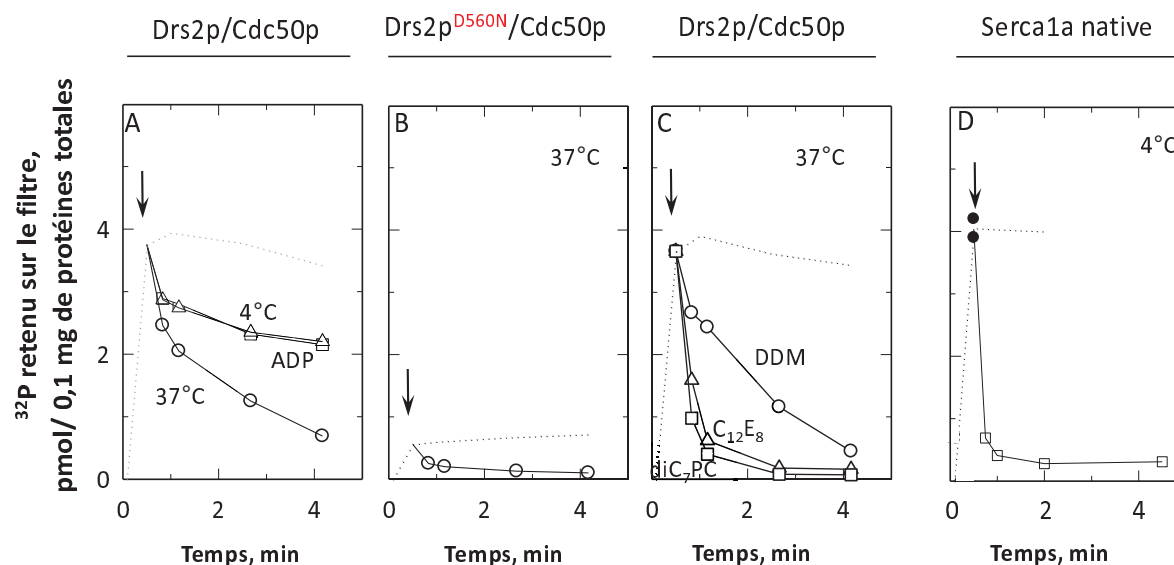


Figure 21. Cinétique de déphosphorylation du complexe Drs2p/Cdc50p.

Les membranes C3 contenant Drs2p (**A** et **C**) ou Drs2p^{D560N} (**B**) co-exprimés avec Cdc50p ont été utilisées. Pour contrôle, des membranes de levures transformées par le vecteur vide, auxquelles on a ajouté des membranes du réticulum sarcoplasmique, ont aussi été testées (**D**, 5 µg/ml de protéines du réticulum sarcoplasmique pour 0,5 mg/ml de protéines totales, soit ~1% des protéines totales). Les cinétiques de déphosphorylation ont été réalisées après phosphorylation pendant 25 secondes dans la glace permettant d'atteindre l'état stationnaire, dans les conditions précédemment décrites. La déphosphorylation a été déclenchée par l'ajout d'ATP non-radioactif (1 mM Mg²⁺-ATP) ou d'ADP 1 mM (panneau A, triangles), et transfert immédiat à 37°C si souhaité. Le protocole utilisé ici, dit « avec dilution », consiste à diluer 5 fois l'échantillon phosphorylé (200 µL à 0,5 mg/mL) dans le milieu de déphosphorylation (800 µL de tampon A (100 mM KCl, 5 mM MgCl₂ et 50 mM Mops-Tris à pH 7) supplémenté avec 100 µM de CaCl₂) contenant 5 mM de Mg²⁺-ATP non-radioactif et pré-équilibré à 37°C. Lorsque la déphosphorylation a été réalisée à 4°C en présence de 1 mM d'ATP ou ADP, il a été ajouté 0,01 mg/mL de pyruvate kinase et 0,2 mM de phosphoénolpyruvate. La précipitation des protéines après différents temps de déphosphorylation a été effectuée par ajout d'1 mL d'acide (1 M TCA et 60 mM H₃PO₄). **B** et **C**. Les mesures ont été réalisées à 37°C. **C**. Les membranes C3 ont été initialement solubilisées par le DDM, à une concentration de DDM de 1 mg/mL (i.e. avec un ratio DDM/protéines totales de 2 g/g). Le milieu de déphosphorylation dans lequel l'échantillon phosphorylé a été dilué 5 fois contenait le détergent choisi à la même concentration de 1 mg/ml (DDM représenté par les cercles, C₁₂E₈ représenté par les triangles ou diC₇PC représenté par les carrés), et donc, compte tenu de la dilution, dans un ratio C₁₂E₈/DDM ou diC₇PC/DDM de 4 g/g. **D**. Le dérivé phosphorylé à l'état stationnaire de Serca1a a été mesuré (cercles noirs) et sa cinétique de déphosphorylation à 4°C aussi (carrés blancs). Dans tous les cas la ligne en pointillés représente la cinétique de phosphorylation à 4°C (points expérimentaux non montrés).

Nous nous sommes intéressés par la suite à tester l'effet des lipides sur la cinétique de déphosphorylation de Drs2p. En effet, tout comme la fixation du K⁺ dans le cas de l'ATPase-Na⁺/K⁺, la fixation de la phosphatidylsérine sur son site de transport est supposée permettre la déphosphorylation de Drs2p (cf. Chapitre « Introduction »). Comme on peut le voir sur la Figure 22 (panneau A), l'addition de phosphatidylsérine exogène (POPS), après solubilisation des membranes C3 avec un ratio DDM/protéines totales élevé (10 g/g), entraîne au contraire un ralentissement de la déphosphorylation de Drs2p. Cet effet, mais moins prononcé, est aussi constaté lorsque les

membranes C3 sont solubilisées en présence de DDM et de phosphatidylcholine (POPC) exogène (panneau B). Une addition supplémentaire de POPS ralentit à nouveau la déphosphorylation (panneau B). Cet effet inhibiteur de la POPS ou de la POPC n'est pas lié à la nature de leurs acides gras puisque la DMPS, ou encore un mélange de lipides d'*E. coli* riche en diverses formes de PS, ou encore la DOPC, entraînent aussi un ralentissement de la déphosphorylation (données non montrées).

Devant ce résultat que nous n'avions pas anticipé, nous nous sommes demandés s'il ne manquait pas un élément essentiel pour la déphosphorylation de Drs2p dans les membranes C3. Or, il a été très récemment montré que l'activité de transport de la NBD-PS par Drs2p était stimulée par la présence de PI(4)P et que l'extrémité C-terminale de Drs2p possédait un site de fixation pour le PI(4)P (Natarajan et al., 2009). Dans cette optique, nous avons testé l'effet du PI(4)P sur la cinétique de déphosphorylation de Drs2p, en absence et en présence de POPS exogène. Comme le montre le panneau C de la Figure 22, en présence de PI(4)P, l'addition de POPS accélère maintenant la déphosphorylation, comme espéré sur la base des schémas de fonctionnement des ATPases de type P. Notons que le PI(4)P seul accélère très légèrement la déphosphorylation, probablement à cause de la présence de PS endogène.

Le PI(4)P se fixant très probablement sur l'extrémité C-terminale de Drs2p (Natarajan et al., 2009), nous avons voulu exclure la possibilité que l'étiquette Bad, présente en C-terminal de Drs2p, puisse interférer avec nos mesures des vitesses de déphosphorylation. Pour cela, nous avons eu recours à des constructions dans lesquelles Drs2p est séparée de l'étiquette Bad par un site de coupure par la protéase TEV (et non pas par la thrombine, voir justification dans le Chapitre « Purification »). Les membranes C3 co-exprimant Drs2p et Cdc50p ont été incubées avec la TEV, puis traitées comme précédemment pour la mesure de la formation de dérivé phosphorylé et de la cinétique de déphosphorylation. Comme le montre la Figure 22 (panneau D), Drs2p débarrassée de son étiquette Bad C-terminale se comporte de façon similaire à Drs2p-Bad, ce qui suggère que l'étiquette n'a pas d'influence sur la capacité de la PS à stimuler la déphosphorylation en présence de PI(4)P. Pour contrôle, une analyse par western-blot montre que la protéase TEV a effectivement clivé les étiquettes fusionnées à Drs2p et Cdc50p, puisque le signal spécifique des étiquettes disparaît après incubation avec la protéase.

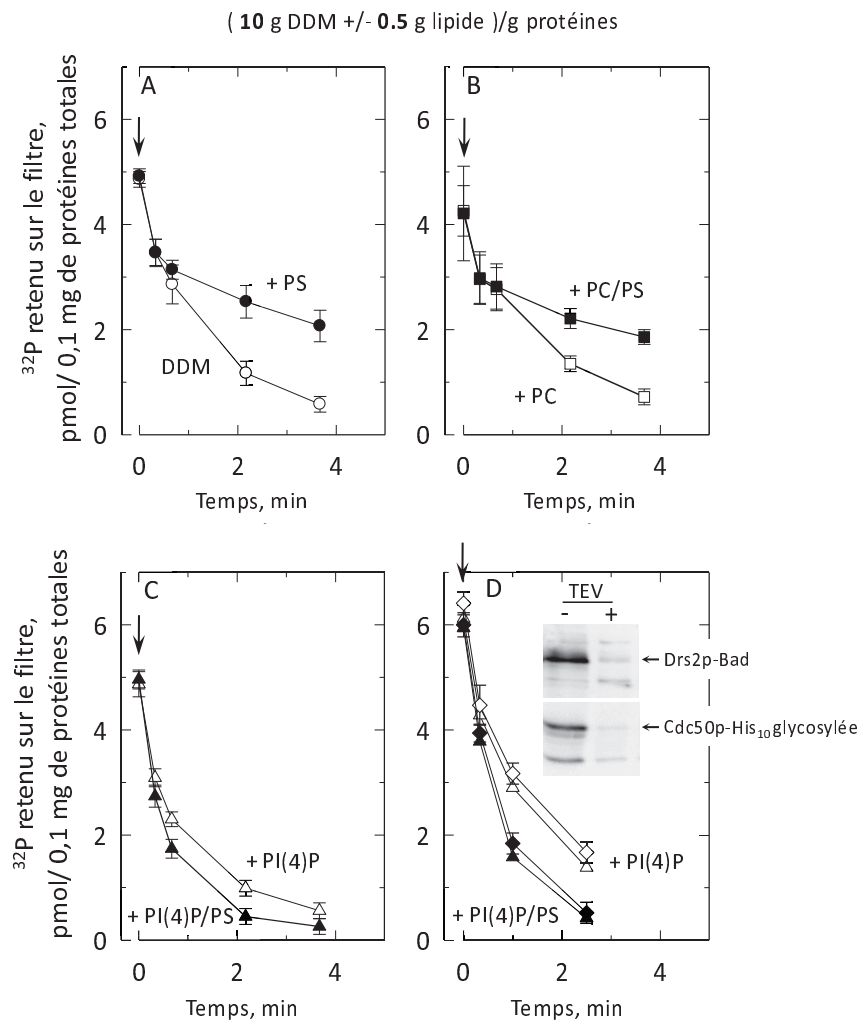


Figure 22. Effet de différents lipides sur la cinétique de déphosphorylation de Drs2p.

Les membranes C3 contenant Drs2p et Cdc50p, diluées à 0,5 mg/mL dans 200 μ L du tampon A (100 mM KCl, 5 mM MgCl₂ et 50 mM Mops-Tris à pH 7) supplémenté de 100 μ M CaCl₂ et 1 mM EGTA, ont été solubilisées par 5 mg/mL de DDM, en présence ou en absence de 0,25 mg/mL de lipides. Après phosphorylation pendant 25 secondes dans la glace, les cinétiques de déphosphorylation ont été réalisées avec un protocole « sans dilution » : la déphosphorylation a été déclenchée par transfert dans un tube pré-équilibré à 37°C contenant 20 μ L de Mg²⁺-ATP non radioactif à 10 mM. **A.** Cercles blancs : DDM seul. Cercles noirs : DDM + POPS. **B.** Carrés blancs : DDM+POPC. Carrés noirs : DDM+POPC+POPS. **C.** Triangles blancs : DDM+PI(4)P. Triangles noirs : DDM+PI(4)P+POPS. **D.** Symboles blancs : DDM+ PI(4)P. Symboles noirs : DDM+ PI(4)P+ POPS. Triangles : avant clivage par la protéase TEV. Losanges : après clivage par la protéase TEV. Le clivage a eu lieu pendant la nuit à 4°C en présence de la protéase TEV. 2 μ g de protéines totales ont été déposées sur SDS-PAGE. La présence de Drs2p-Bad est révélée par la sonde avidine et la présence de Cdc50p-His₁₀ par la sonde histidine.

h) Discussion

La qualité des membranes C3 que nous avons obtenues, après co-expression de Drs2p-Bad et de Cdc50p-His₁₀, nous a permis d'étudier la phosphorylation et la déphosphorylation du complexe Drs2p/Cdc50p sans avoir besoin de le purifier. 3% de Drs2p dans les membranes C3 conduisent à un niveau de phosphorylation à l'état stationnaire de ~3 pmol de ³²P pour 100 µg de protéines totales, soit 1 nmol de ³²P par mg de Drs2p ou 0,15 mol de ³²P par mol de Drs2p. Ceci est comparable à la stœchiométrie de 0,2 mol de ³²P par mol d'ATP8A2 observée pour ATP8A2 purifiée en absence de PS (Coleman et al., 2012). En revanche, c'est inférieur à la mesure obtenue dans le cas de l'ATPase-Ca²⁺, Serca1a, qui est de 4 nmol de ³²P par mg de réticulum sarcoplasmique, soit quasiment 1 mol de ³²P par mol de Serca1a. Néanmoins, la qualité des membranes C3 obtenues suffit pour mesurer cette phosphorylation avant toute purification (même si cela ne préjuge pas de l'activité ATPasique spécifique de Drs2p). Rappelons que la stœchiométrie de phosphorylation mesurée précédemment pour Drs2p était seulement de 0,02-0,03 mol de ³²P par mol de Drs2p purifiée (Lenoir et al., 2009), et pour ATP8B1 ou ATP8B2, de 0,01 mol de ³²P par mol d'ATP8B1 ou de 0,0004 mol de ³²P par mol d'ATP8B2 (Bryde et al., 2010). Cet avantage est important pour la dissection du mécanisme moléculaire du transport de lipides réalisé par le complexe Drs2p/Cdc50p.

Des études antérieures ont montré la nécessité de la présence des protéines de la famille CDC50 pour l'adressage (Chen et al., 1999; Furuta et al., 2007; Saito et al., 2004) mais aussi pour la fonction des ATPases P4 associées. Par exemple, Lenoir et ses collègues ont montré que le niveau de phosphorylation de Drs2p était 6 fois supérieur en présence de Cdc50p qu'en son absence (4 mmol de ³²P par mol de Drs2p contre 24 mmol de ³²P par mol de Drs2p en présence de Cdc50p (Lenoir et al., 2009)). De même, pour ATP8B1 ou ATP8B2, il a été montré par la méthode des gels acides (dits « Sarkadi ») que la protéine CDC50A était indispensable pour la détection d'un dérivé phosphorylé, puisqu'on ne détecte pas de dérivé phosphorylé en son absence (Bryde et al., 2010). D'autre part, il a été montré que la capacité d'ATPases P4 de plantes, ALA2 et ALA3, ou de mammifères, ATP8B1, à transporter la NBD-PS était dépendante de la présence de leur sous-unités associées ALIS (équivalentes aux protéines CDC50 pour les plantes, (Lopez-Marques et al., 2010)) ou CDC50A (Bryde et al., 2010), respectivement. Nous avons vu que dans notre cas, la co-expression de Drs2p avec Cdc50p était aussi indispensable à la phosphorylation de Drs2p. Ceci corrobore donc les études précédentes.

Au vu de la différence de niveau de phosphorylation à l'état stationnaire pour Drs2p, dans les membranes C2 et C3, nous nous sommes demandé si les glycosylations de Cdc50p étaient importantes pour la phosphorylation de Drs2p, puisqu'une autre différence entre les membranes C2 et C3 est la glycosylation de Cdc50p. Nos résultats ont montré que, après formation du complexe Drs2p/Cdc50p, la déglycosylation de Cdc50p n'était pas critique. Des résultats précédents avaient d'ailleurs montré que des mutations individuelles des sites de glycosylation prédits n'avaient pas d'effet sur le transport de NBD-PS par le complexe ATP8A2/CDC50A, contrairement aux mutations multiples (Coleman and Molday, 2011). Ainsi, la glycosylation des protéines CDC50 est probablement importante dans les étapes initiales de la formation du complexe des protéines CDC50 avec les ATPases P4, et dans l'adressage du complexe, plutôt que *via* son effet intrinsèque au sein du complexe.

Les protéines CDC50 ont quelques caractéristiques en commun avec les sous-unités β des ATPases de type P de la sous famille P_{2C} (Na^+/K^+ -ATPase et H^+/K^+ -ATPase ; (Puts and Holthuis, 2009)). Ces deux familles de protéines contiennent une courte extrémité N-terminale du côté cytoplasmique, liée par une hélice transmembranaire à un large ectodomaine globulaire. Ce dernier comporte des cystéines conservées qui forment des ponts disulfures, ainsi que des sites de glycosylation. Cependant, dans le cas des protéines CDC50, cet ectodomaine serait lié par une autre hélice transmembranaire à une courte extrémité C-terminale, localisée du côté cytoplasmique elle aussi, et il n'y a *a priori* pas de lien évolutif entre les sous-unités CDC50 et les sous-unités β , puisqu'il n'y a pas d'homologie de séquence identifiable entre elles. Quoi qu'il en soit, les sous-unités CDC50 et les sous-unités β sont toutes deux requises pour l'export de leur partenaire du réticulum endoplasmique, mais on ignore si c'est leur seul rôle. Des études ont suggéré que ces sous-unités interagissaient plutôt avec les formes « E2 » des ATPases de type P4 et P2, et seraient donc impliquées dans le transport du substrat du côté externe vers le côté interne (Durr et al., 2008; Lenoir et al., 2009).

Nous avons testé l'effet du cobalt et du zinc sur la mesure du niveau de phosphorylation car il a été montré qu'ils étaient toxiques pour les levures délétées pour les ATPases P4 (Siegmund et al., 1998). Cependant, dans notre étude, ces ions n'ont pas d'effet direct sur la phosphorylation de Drs2p. L'EDTA quant à lui a un effet explicable par le fait que le substrat des ATPases de type P est le Mg^{2+} -ATP. Le calcium, le sodium, le zinc, le cobalt, le lanthane, le sulfate, l'oxalate ou l'arsenate ne sont donc probablement pas transportés du côté interne vers le côté externe en échange du phospholipide. Ceci corrobore les résultats récents qui ont suggéré que la fixation d'un ion sur la forme « E1 », et son transport, par ATP8A2, et plus généralement par les ATPases P4, ne seraient pas nécessaires pour la réalisation du cycle catalytique par l'ATPase (Coleman et al., 2012).

Lors de la mesure du niveau de phosphorylation, un composant insensible au vanadate a été observé. Ce composant est probablement dû à la phosphorylation de protéines autres que Drs2p, voire aussi à la phosphorylation de Drs2p par des kinases, ailleurs que sur l'aspartate 560.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'effet d'inhibiteurs connus des ATPases de type P sur la formation de dérivé phosphorylé. L'inhibition par le vanadate avait déjà été montrée pour Drs2p et ATP8B1 (Bryde et al., 2010; Lenoir et al., 2009). Drs2p est inhibé par le vanadate pour des concentrations de l'ordre du micromolaire, et assez rapidement (~1 minute), quelle que soit la température. Il est connu que pour les ATPases de type P2, le vanadate se lie à la forme « E2 » suggérant que Drs2p est plutôt sous une conformation de type « E2 » dans les membranes C3.

Nous avons aussi testé les composés fluorés qui interagissent avec les conformations de type « E2 » de certaines ATPases P2. Le fluorure d'aluminium, de béryllium et de magnésium inhibent Drs2p avec des vitesses relatives similaires à celles observées pour Serca1a. Par ailleurs, dans l'objectif de purifier le complexe, nous nous sommes rappelés que les composés fluorés avaient permis l'obtention de la structure de Serca1a en absence de calcium et de thapsigargine (Olesen et al., 2007; Toyoshima, 2007) : en effet, l'addition des inhibiteurs permet de stabiliser Serca1a lors de la solubilisation, alors que, en absence d'inhibiteurs, Serca1a s'inactive rapidement dès l'ajout de détergent. Les composés fluorés pourraient donc nous permettre de stabiliser Drs2p pendant sa purification. Il semble même envisageable, pour réaliser des mesures fonctionnelles après purification, de pouvoir ensuite relarguer ces inhibiteurs. Nos résultats montrent que l'on peut relarguer le fluorure d'aluminium de trois manières : la première en utilisant l'EGTA pour chélater

l'aluminium, la seconde en utilisant le chélateur de fer et d'aluminium, la Desferrioxamine B, et le troisième en rendant le pH plus alcalin (en effet, le complexe inhibiteur est AlF_4^- qui entre en compétition avec $\text{Al}(\text{OH})_4^-$ aux pH alcalins).

Concernant l'étude de la solubilisation du complexe, nous avons essayé des conditions ayant déjà été mises à profit pour l'étude d'ATPases P4, comme le mélange CHAPS, DTT et lecithine d'œuf pour ATP8A2 (Coleman et al., 2009) ou la digitonine pour Drs2p (Lenoir et al., 2009). Nous avons aussi essayé le DDM, qui est un détergent doux qui a été utilisé avec succès pour l'obtention de la structure de la pompe à proton de plantes AHA2 (Pedersen et al., 2007), et le C_{12}E_8 , utilisé avec succès pour l'obtention de la structure de Serca1a par notre laboratoire (Jidenko et al., 2005). Il en est ressorti que le DDM était le meilleur choix pour solubiliser le complexe Drs2p/Cdc50p glycosylé, tout en maintenant la formation de quantités suffisantes d'enzyme phosphorylée, et en minimisant l'inactivation irréversible induite par la plupart des détergents. Cet effet protecteur est peut-être dû à une délipidation moindre et à une meilleure préservation de l'interaction entre Drs2p et Cdc50p.

Nous avons aussi mesuré la cinétique de déphosphorylation de Drs2p, en commençant par phosphoryler Drs2p jusqu'à atteindre l'état stationnaire avec de l'ATP radioactif puis en chassant cet ATP radioactif par un large excès d'ATP non radioactif. Dans ces conditions, Drs2p phosphorylée termine son cycle catalytique mais prend au cycle suivant un ATP non radioactif au lieu d'un ATP radioactif ; la cinétique de déphosphorylation limite le turnover du catalytique global. Nous avons observé que la déphosphorylation de Drs2p était bien dépendante de la température, comme on l'attend, mais qu'elle était très lente : 1 à 2 minutes à 37°C (à titre de comparaison celle de Serca1a est terminée en 2 secondes à 4°C). D'autre part, la déphosphorylation de Drs2p semble insensible à l'ADP. Comme par ailleurs la reformation d'ATP à partir d'ADP par la conformation « E1P » est *a priori* très rapide (tandis que la conformation « E2P » ne peut plus reformer l'ATP, d'où les appellations « conformation de basse (« E2P ») ou haute énergie (« E1P ») »), ceci suggère fortement que Drs2p phosphorylé serait plutôt dans une conformation de type « E2P ».

C'est la première fois que l'on est capable de mesurer une cinétique de déphosphorylation pour Drs2p, montrant que le complexe Drs2p/Cdc50p est capable de réaliser un cycle catalytique complet. Les travaux précédents n'avaient pas réussi à montrer que les complexes Drs2p/Cdc50p et ATP8B1/CDC50A étaient capables de réaliser un tel cycle complet (Bryde et al., 2010; Lenoir et al., 2009).

Sur la base de mesures d'activité ATPasique, il a cependant été suggéré que 1 molécule de Drs2p serait capable d'hydrolyser 70 ATPs par minute (Zhou and Graham, 2009). Ceci est beaucoup plus rapide que ce que l'on s'attendrait à mesurer au vu de nos cinétiques de déphosphorylation de Drs2p (Fig. 20, 1 ATP toutes les 2 minutes). Il faut noter que la mesure d'activité ATPasique dans l'étude de Zhou & Graham de 2009 était réalisée en présence du détergent C_{12}E_9 , dont la structure est proche du C_{12}E_8 que nous avons utilisé. La vitesse de déphosphorylation de Drs2p est plus élevée dans ce dernier détergent que dans le DDM ou en membrane (Fig. 20), ce qui impliquerait un turnover plus élevé. De plus, le transport de NBD-PS par Drs2p lors de cette étude (3 NBD-PS transportés par minute par Drs2p (Zhou and Graham, 2009)) était plus lent que celui attendu sur la base de la vitesse d'hydrolyse de l'ATP mesurée (en supposant qu'1 molécule d'ATP permet le transport d'1 molécule de NBD-PS).

Si maintenant on considère une autre ATPase P4, ATP8A2 préparée à partir des photorécepteurs de la rétine, sa déphosphorylation est beaucoup plus rapide que celle de notre complexe Drs2p/Cdc50p (Coleman et al., 2012). La déphosphorylation d'ATP8A2 est quasiment aussi rapide que celle de Serca1a. Et cette déphosphorylation d'ATP8A2, de même que son activité ATPasique, sont stimulées par la PS.

Les raisons d'une telle différence d'activité entre ATP8A2 et Drs2p sont inconnues. Il est possible que le transport de lipides, rapide, bidirectionnel et indépendant de l'ATP, catalysé par l'opsine dans les membranes des cellules des photorécepteurs de la rétine (Menon et al., 2011), nécessite la présence d'une flippase dont la vitesse de transport doit être très élevée pour que la PS reste majoritairement localisée dans le feuillet cytosolique. Et comme aucune flip-flopase indépendante de l'ATP n'a été identifiée dans les membranes du *trans*-Golgi de la levure, il ne serait pas nécessaire que, dans la levure, le transport de lipides pour maintenir l'asymétrie soit aussi rapide. On ne peut, par ailleurs, pas exclure que l'environnement lipidique nécessaire à l'activité de Drs2p soit en partie perdu après la relativement longue préparation nécessaire pour obtenir les membranes C3, et que cela perturbe l'activité catalytique de la protéine.

Évidemment, il serait intéressant de pouvoir mesurer l'activité ATPasique de Drs2p dans nos membranes C3. Malheureusement il nous est impossible de mesurer cette activité ATPasique de Drs2p en membrane, à cause de la présence d'une activité d'hydrolyse de base, contaminante, due probablement à d'autres ATPases (entre autres, l'ATPase à proton de la membrane plasmique de levure, Pma1p dont la présence est confirmée par western-blot, Fig. 10). En effet, même en présence d'azide qui inhibe les ATPases de mitochondrie, l'activité dans les membranes C3 est de 50 à 100 nmol d'ATP hydrolysé par minute par mg de protéines totales (pour les membranes contenant Drs2p sauvage ou mutante et en présence de Cdc50p) à 30°C et en présence de 1 mM d'ATP (données non montrées), alors que, sur la base de la cinétique de déphosphorylation du complexe Drs2p/Cdc50p, on s'attend à mesurer pour le complexe une activité 100 à 1000 fois inférieure. Nous aurons donc besoin de purifier le complexe Drs2p/Cdc50p pour réaliser la mesure de son activité ATPasique.

Pour étudier l'effet des lipides sur Drs2p, nous avons commencé par tester l'effet de différents détergents sur la cinétique de déphosphorylation du complexe. En effet, les détergents sont nécessaires pour pouvoir délivrer un lipide insoluble dans l'environnement d'une protéine membranaire. Par chance, le DDM ne perturbe pas beaucoup la cinétique de déphosphorylation (celle-ci est par contre accélérée en présence de C₁₂E₈ ou diC₇PC, ce qui explique peut-être le niveau plus faible de phosphorylation à l'état stationnaire de Drs2p dans ces détergents).

Nous nous sommes alors intéressés particulièrement à l'effet de la PS. Dans le cas des ATPases de type P2 (Serca1a et Na⁺/K⁺-ATPase, par exemple), la fixation de l'ion contre-transporté (H⁺ ou K⁺) après la transition « E1P-E2P » déclenche la déphosphorylation. Dans le cas des ATPases de type P4, la fixation du substrat de transport (pour Drs2p, la PS) devrait donc également stimuler la déphosphorylation de la protéine. Or, lorsque nous avons mesuré la cinétique de déphosphorylation de Drs2p, en présence d'une grande quantité de DDM qui va largement diluer les protéines et les lipides endogènes, la déphosphorylation a été *ralentie* par l'addition de PS. L'effet stimulateur de la PS sur la cinétique de déphosphorylation n'a été observé qu'en présence de PI(4)P. Cet effet du PI(4)P sur la déphosphorylation de Drs2p est en adéquation avec ceux montrant que le PI(4)P stimule le transport de NBD-PS au niveau des membranes du *trans*-Golgi (Natarajan et al., 2009).

Il peut sembler bizarre que le substrat (PS) ne stimule pas dans tous les cas le cycle catalytique de l'enzyme sur laquelle il se fixe. Mais il se pourrait que, en absence de PI(4)P, la PS ajoutée puisse

accéder à son site de fixation sans pouvoir être transportée ; cette fixation pourrait bloquer la protéine dans la conformation « E2P », et seule la fixation de PI(4)P permettrait de débloquent la protéine, le transport de la PS et le cycle catalytique.

Nous avons observé qu'en présence de faibles quantités de détergent, la PS seule ne ralentit plus la déphosphorylation tandis que le PI(4)P stimule la déphosphorylation en présence ou en absence de PS exogène (Fig. 23). Il se pourrait que, dans ce cas-là, la quantité de détergent utilisée ne soit pas suffisante pour déplacer la PS endogène, et que l'ajout de PI(4)P exerce un effet stimulateur parce qu'il serait initialement absent des membranes C3, à cause de sa courte durée de vie dans les membranes.

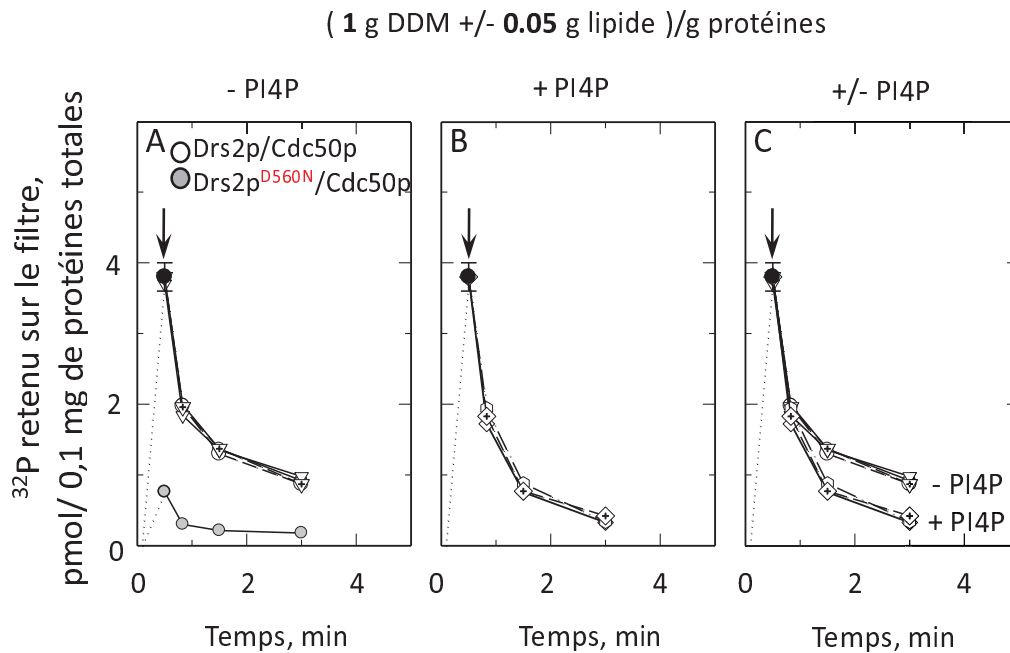


Figure 23. Effet de différents lipides sur la cinétique de déphosphorylation de Drs2p en présence de faibles quantités de DDM.

Les membranes C3 contenant Drs2p (ou Drs2p^{D560N}, cercles gris panneau A) et Cdc50p ont été diluées à 0,5 mg/mL dans 200 μ L du tampon A (100 mM KCl, 5 mM MgCl₂ et 50 mM Mops-Tris à pH 7) supplémenté de 100 μ M CaCl₂ et 1 mM EGTA, puis solubilisées par 0,5 mg/mL de DDM, en absence ou en présence de 0,025 mg/mL de lipides. Les cinétiques de déphosphorylation ont été réalisées après phosphorylation pendant 25 secondes dans la glace permettant d'atteindre l'état stationnaire, dans les conditions précédemment décrites. La déphosphorylation a été déclenchée par transfert dans un tube pré-équilibré à 37°C contenant 20 μ L de Mg²⁺-ATP non-radioactif à 10 mM (protocole « sans dilution »). **A.** Cercles blancs : DDM seul. Cercles gris : Drs2p^{D560N}/Cdc50p en présence de DDM seul. Cercles blancs avec une croix : DDM+POPS. Triangles inversés : DDM+POPC. Triangles inversés avec une croix : DDM+POPS+POPC **B.** Losanges blancs : DDM+PI(4)P. Losanges blancs avec une croix : DDM+PI(4)P+POPS. Hexagones : DDM+PI(4)P+POPC. **C.** Superposition des panneaux A et B. Dans tous les cas, le dérivé phosphorylé initialement formé à l'état stationnaire en présence d'ATP radioactif a été mesuré (cercles noirs avec la barre d'erreurs).

Rappelons que le PI(4)P est un régulateur important du trafic membranaire, en permettant, notamment, le recrutement des effecteurs nécessaires à la formation des vésicules à clathrine (Wang

et al., 2003). L'effet du PI(4)P sur la déphosphorylation de Drs2p est donc en adéquation avec l'implication de cette la « flippase » Drs2p dans le trafic membranaire.

En résumé, nous avons réussi à mettre au point une procédure de *co-expression* qui nous permet d'obtenir une fraction membranaire contenant 3% de Drs2p (10 mg à partir de 1L de culture). Cette fraction, enrichie en un complexe de Drs2p et Cdc50p glycosylée actif, nous a permis de commencer à caractériser ce complexe du point de vue de sa fonction. Pour des études plus approfondies de l'activité catalytique de ce complexe, du mécanisme du transport de lipides qu'il réalise probablement, et pour sa cristallisation en vue d'études structurales, nous devons maintenant purifier ce complexe après l'avoir solubilisé par un détergent. Dans le cas où le complexe serait instable en présence de grandes quantités de détergent, nous pourrions envisager d'utiliser les composés fluorés qui ont déjà servi pour la cristallisation de Serca1a en absence de calcium, et notamment le fluorure d'aluminium dont nous serons aussi capables de lever l'inhibition pour des études fonctionnelles ultérieures.

III.2 Purification du complexe Drs2p/Cdc50p

III.2.1 Introduction

Pour permettre la poursuite de l'étude fonctionnelle du complexe et le démarrage de son étude structurale, nous devons le purifier ; cette future étude structurale nécessitera en outre l'obtention de grandes quantités du complexe purifié.

Notre stratégie initiale pour cette purification était, après solubilisation des membranes C3, de réaliser une purification par chromatographie d'affinité en tandem : nous pensions utiliser tout d'abord une résine Ni^{2+} -NTA pour retenir Cdc50p-His₁₀ (par l'intermédiaire de son étiquette de 10 histidines) en complexe ou non avec Drs2p. Ensuite, l'éluat de la chromatographie d'affinité sur résine Ni^{2+} -NTA devait être mis en présence d'une résine streptavidine pour retenir seulement le complexe protéine Drs2p-Bad biotinylée/protéine Cdc50p-His₁₀. Pour l'élution du complexe, le protocole mis au point au laboratoire par Marie Jidenko (Jidenko et al., 2006) prévoyait enfin l'utilisation d'une protéase pour séparer la protéine de son étiquette Bad (et ainsi éviter d'avoir à utiliser les conditions dénaturantes nécessaires pour rompre la liaison avidine-biotine). Par la suite, après solubilisation des membranes C3, il s'est avéré plus efficace de réaliser directement l'étape de chromatographie par affinité sur résine streptavidine, et nous avons aussi dû changer la protéase utilisée. Les résultats présentés dans ce chapitre font l'objet d'un article en cours de rédaction.

III.2.2 Essais initiaux de purification par chromatographie d'affinité en tandem

La première étape initialement prévue faisait appel à l'utilisation d'une résine Ni^{2+} -NTA. Les résultats de l'expérience sont présentés sur la Figure 1. Dans l'expérience illustrée sur cette Figure, Drs2p-Bad et Cdc50p-His₁₀ glycosylée ont été solubilisées en partie (comparer les puits « T_{DDM} » et « S_{DDM} » en western-blot, Fig. 1B) et se sont toutes les deux, pour l'essentiel, fixées à la résine Ni^{2+} -NTA (comparer le solubilisé (« S_{DDM} ») et le non retenu (« NR »), Fig. 1B), comme nous l'avons déjà vu dans le chapitre précédent sur la Figure 13. Après élution par 250 mM d'imidazole les western-blots révèlent à la fois Drs2p-Bad et Cdc50p-His₁₀, comme espéré (Fig. 1B & 1C, puits « E1_{NTA} »).

Sur le gel coloré au bleu de Coomassie (Fig. 1A), le puits « E1_{NTA} » montre un enrichissement évident pour Cdc50p-His₁₀ glycosylée (masse moléculaire estimée à 45 kDa auxquels il faut ajouter les glycosylations) ; mais dans la zone de migration où Drs2p-Bad est attendue, on voit deux polypeptides au lieu d'un : l'un avec la masse attendue (masse moléculaire estimée à 163 kDa), et l'autre migrant un peu plus vite. Ce deuxième peptide correspond probablement à une version tronquée de Drs2p-Bad, puisqu'il est également révélé par un anticorps anti-Drs2p (Fig. 1C, α -Drs2p), et la troncature semble avoir eu lieu dans la partie C-terminale de Drs2p puisque que ce deuxième peptide n'est pas détecté par la sonde avidine (Fig. 1B) (il est nommé « Drs2p- Δ Cter » sur la Figure 1A). Il reste un peu de Drs2p-Bad et de Cdc50p-His₁₀ retenu sur la résine Ni^{2+} -NTA (sonde avidine et sonde histidine, Fig. 1B, puits « R* »).

On estime avoir obtenu 40 μg de Drs2p dans l'éluat 1 (puits « E1_{NTA} »), dans un éluat à 50 ng de Drs2p/ μL , en comparant, par bleu de Coomassie, l'intensité de la bande correspondant à Drs2p-Bad avec celle d'une gamme de réticulum sarcoplasmique (Fig. 1A). Au départ, nous avons 10 mL à

2 mg/mL, soit 20 mg de membranes C3 contenant 3% de Drs2p-Bad (Fig. 9, Chapitre III.1), soit 600 µg de Drs2p. En tenant compte de l'éluat 2, qui contient aussi 40 µg de Drs2p et qui n'est pas montré ici, on obtient donc un rendement d'environ 14 % (par rapport à la quantité de au Drs2p contenue dans les C3). Ce faible rendement à la fin de cette première étape laisse supposer que l'on obtiendra très peu de complexe Drs2p/Cdc50p à la fin de la seconde étape.

Par ailleurs, nous avons déduit de ces essais que Cdc50p-His₁₀ était plutôt en excès par rapport à Drs2p-Bad (et non l'inverse). En effet, la quasi-totalité de Cdc50p-His₁₀ et de Drs2p est retenue sur la résine Ni-NTA (comparer le puits « S_{DDM} » au puits « NR_{NTA} », sur les 3 gels de la Figure 1C). Nous en avons déduit qu'une purification en une étape sur la résine streptavidine serait probablement suffisante pour nous permettre de ne récupérer que le complexe Drs2p/Cdc50p, sans avoir nécessairement recours à une purification en tandem. Une purification en une seule étape nous permettrait aussi de raccourcir le temps d'exposition du complexe Drs2p/Cdc50p à de fortes quantités de détergents, dont l'effet sur l'inactivation de Drs2p a été étudié dans le Chapitre III.1, Figure 20. Après plusieurs tentatives pour améliorer la qualité de la purification par résine Ni²⁺-NTA, cette stratégie de purification par deux chromatographies successives sera donc finalement abandonnée (voir plus loin). Mais ces essais initiaux avec la résine Ni-NTA nous ont permis quelques observations supplémentaires utiles. Par exemple, sur le gel révélé par α-Drs2p de la Figure 1C, nous avons aussi remarqué que le fragment tronqué de Drs2p est lui aussi retenu puis élué, ce qui suggérerait que Cdc50p-His₁₀ se complexe presque indifféremment avec Drs2p-Bad ou Drs2pΔCter.

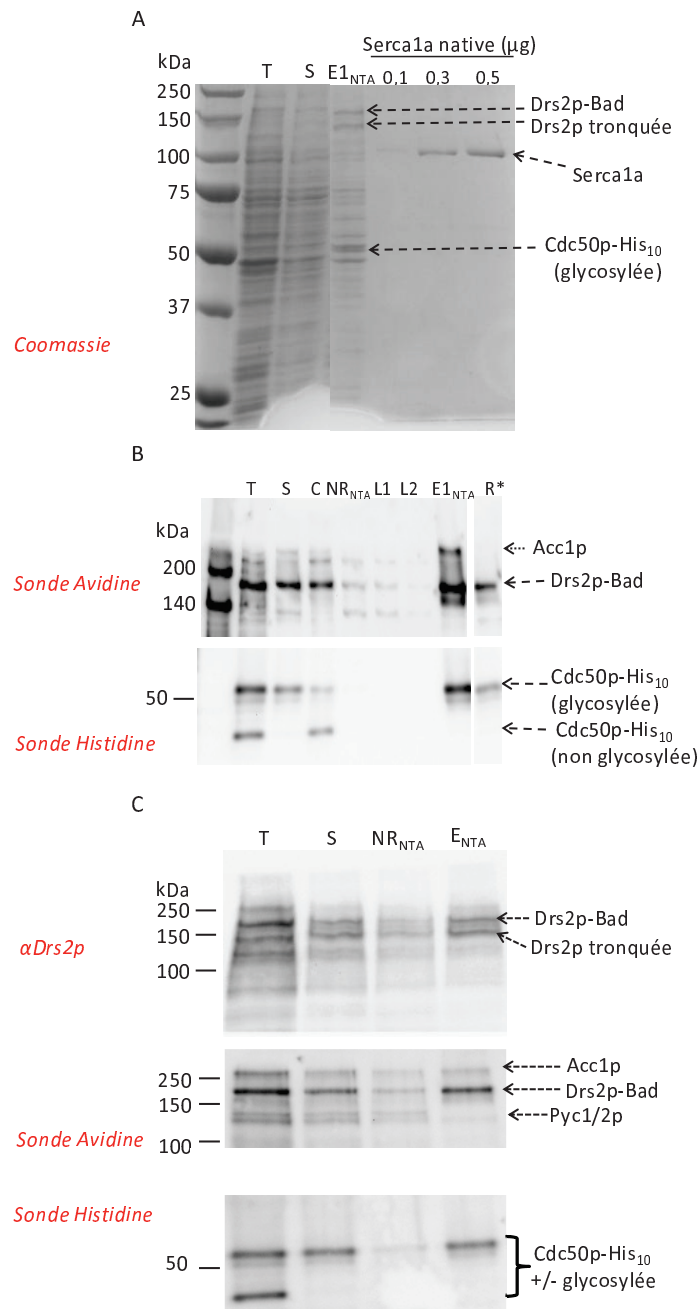


Figure 1. Purification par chromatographie d'affinité sur résine Ni^{2+} -NTA à partir de membranes C3 contenant le complexe Drs2p/Cdc50p.

Les membranes C3 ont été diluées à 2 mg/mL de protéines totales dans le tampon de solubilisation SB (10 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 300 mM NaCl ; 20% (v/v) glycérol ; 5 mM MgCl_2) supplémenté avec 1 mM de PMSF et 1X d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche). Le complexe Drs2p-Bad/Cdc50p- His_{10} a été purifié comme décrit dans le « Matériel et Méthodes », Chapitre II.6.b. **A.** Analyse de la purification par coloration au bleu de Coomassie; 5 μL de chaque fraction a été déposé. **B.** Analyse de la purification par western-blot; 0,4 μL de chaque fraction a été déposé. **C.** Analyse par western-blot de la fixation sur la résine Ni^{2+} -NTA et de l'élution de Drs2p-Bad, Drs2p tronquée et de Cdc50p- His_{10} . Après solubilisation par le DDM dans les conditions classiques d'une purification sur résine Ni^{2+} -NTA, 1 μL de chaque fraction a été déposé. Acc1p, acétyl-CoA carboxylase ; Pyc1/2p, pyruvate carboxylase. La détection de Drs2p-Bad a été effectuée à l'aide d'une sonde avidine ou de l'anticorps α -Drs2p alors que la détection de Cdc50p- His_{10} a été faite à l'aide d'une sonde histidine.

La deuxième étape de ces essais initiaux de chromatographie en tandem (fixation sur résine streptavidine suivie d'une coupure (par la thrombine) entre Drs2p et son étiquette Bad) a été néanmoins réalisée. Sur la Figure 2, on peut voir que Drs2p-Bad issu de la purification Ni^{2+} -NTA (puits « E_{NTA} ») a bien été retenu par la résine streptavidine (puisque'il se retrouve enrichi sur la résine « R₀ », qui représente la totalité des protéines qui sont retenues par la résine streptavidine après lavages). Comme attendu, la protéine tronquée (Drs2p Δ Cter) n'a, elle, pas été retenue puisque, suivant notre hypothèse, Drs2p Δ Cter n'a plus le domaine accepteur de biotine (Bad) qui permet la rétention de Drs2p-Bad par la résine streptavidine (Fig. 2, comparer les puits « E_{NTA} » et « R₀ »). Cdc50p-His₁₀ est elle aussi retenue (mais apparemment en moins grande proportion, comme si Cdc50p-His₁₀ était en excès par rapport à Drs2p-Bad (comme déjà suspecté plus haut), ou comme si le complexe dans « E_{NTA} » était partiellement dissocié, peut être à cause de l'imidazole). Par contre, l'incubation de la résine avec la thrombine ne fait *pas* apparaître le polypeptide Drs2p prévu (puits « R₃₀ », Fig. 2), à la masse moléculaire attendue de 154 kDa, mais des peptides plus courts. Le western-blot (non montré) est rendu compliqué et quasiment indéchiffrable à cause de ces coupures.

La thrombine doit donc posséder dans Drs2p un site de coupure non-prédit par le logiciel PeptideCutter, en plus du site introduit dans notre construction. Ces essais initiaux nous auront donc permis de nous rendre compte que nous devons changer le type de site de coupure. De fait, nous avons par la suite changé le site de clivage entre Drs2p ou Cdc50p et leurs étiquettes respectives : le site de clivage par la protéase TEV, connue pour sa spécificité (Dougherty et al., 1988), a été introduit dans de nouvelles constructions.

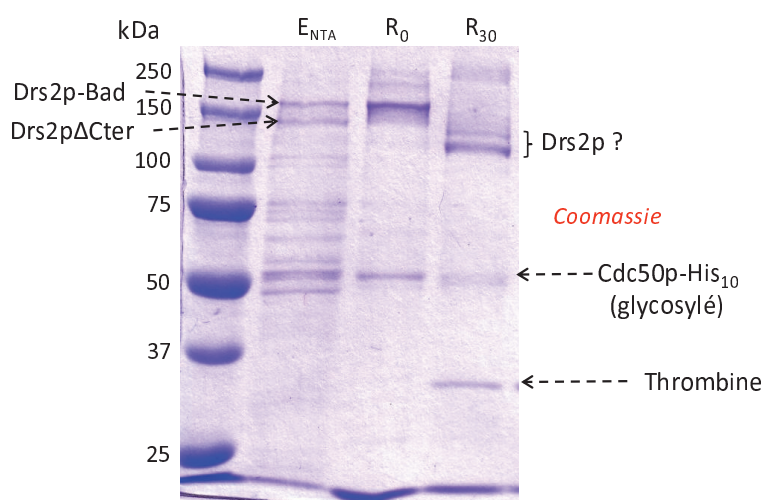


Figure 2. Purification par chromatographie d'affinité sur une résine streptavidine, à partir de l'éluat de la purification sur résine Ni^{2+} -NTA.

Après avoir équilibré la résine streptavidine dans le tampon SSR (50 mM de Mops-Tris pH 7, 100 mM de KCl, 5 mM de MgCl_2 et 20% (v/v) de glycérol) supplémenté de 0,2 mg/mL de DDM, l'éluat Ni-NTA (« E_{NTA} »), dilué 10 fois dans le tampon SSR, a été mis en contact avec la résine streptavidine pendant une nuit à 4°C avec un ratio résine/protéines cibles (Drs2p-Bad) de 1 mL/0,8 mg. Le lendemain, le non retenu a été récupéré par centrifugation à 1000 g pendant 3 minutes et à 4°C (Eppendorf 5430 centrifuge, rotor F35-6-30). La résine a été alors lavée, à 4°C, par 4 volumes de résine avec du tampon SSR modifié (1M de NaCl à la place de 100 mM de KCl) supplémenté avec 0,2 mg/mL de DDM (rotor F241.5P sur Beckman Microfuge 22R), puis avec du tampon SSR supplémenté avec 0,2 mg/mL de DDM et 1,5 mM de CaCl_2 , trois fois en tout. Pour l'éluat, la résine a été

resuspendue dans 1 volume de résine de tampon SSR supplémenté de 0,2 mg/mL de DDM et de 1,5 mM de CaCl_2 , à température ambiante (« R_0 »). On a ajouté alors deux unités de thrombine et on a incubé 30 minutes sur la roue à température ambiante (« R_{30} »). Pour l'analyse par coloration au bleu de Coomassie, 5 μL de chaque fraction a été déposé.

III.2.3 Purification du complexe Drs2p/Cdc50p en une seule étape, par chromatographie d'affinité sur résine streptavidine

a) Obtention de constructions possédant une étiquette clivable par la protéase TEV

Afin de remplacer le site de clivage par la thrombine par un site de clivage par la protéase TEV, nous avons dû commencer par réaliser ce changement sur les vecteurs de simple expression (pYeDP60_DRS2-Bad(TEV); pYeDP60_DRS2^{D560N}-Bad(TEV) et pYeDP60_CDC50-His₁₀(TEV)), puis les vecteurs de co-expression ont été produits de la même manière que précédemment (pYeDP60_DRS2-Bad/CDC50-His₁₀(TEV) et pYeDP60_DRS2^{D560N}-Bad/CDC50-His₁₀(TEV)). La Figure 3 montre que l'introduction d'un site de coupure par la protéase TEV n'altère pas la capacité des constructions contenant DRS2 sauvage et/ou CDC50 à restaurer la croissance à basse température des souches $\Delta drs2$ ou $\Delta cdc50$, respectivement.

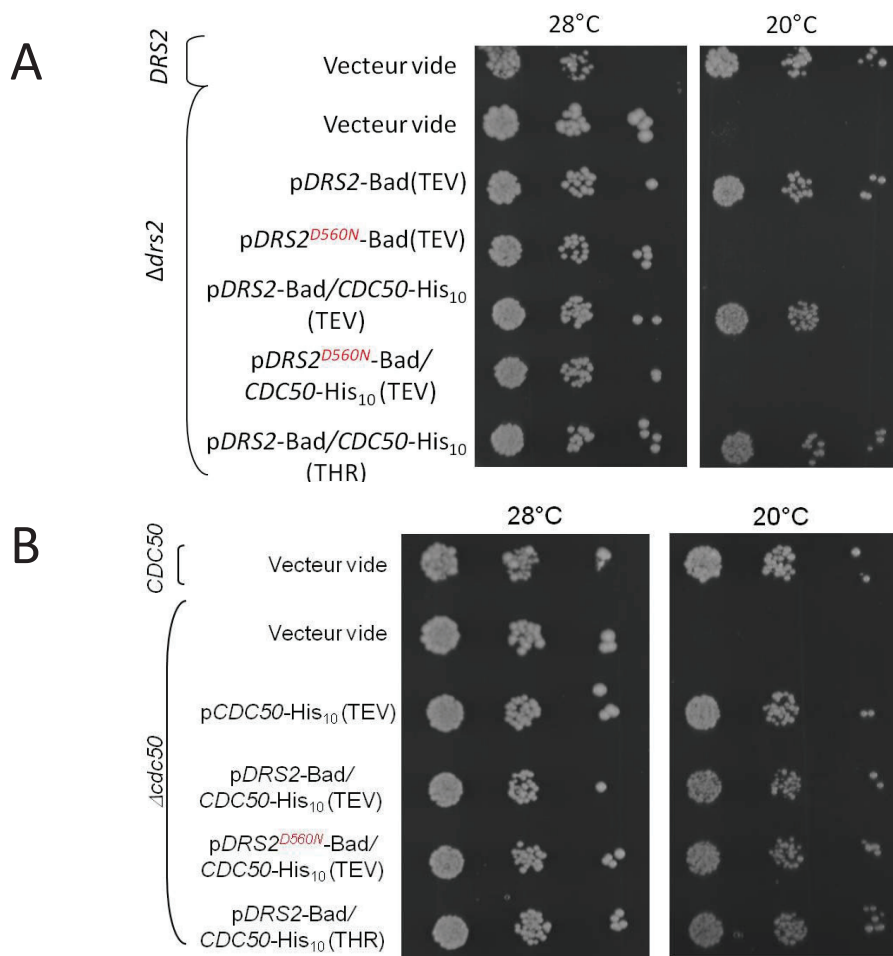


Figure 3. Test de restauration de la croissance des levures $\Delta drs2$ (A) ou $\Delta cdc50$ (B) à basse température.

Les souches de levure délétées ($\Delta drs2$ ou $\Delta cdc50$) ont été transformées par divers vecteurs. Pour contrôle, les souches de levure délétées ou sauvages ont été transformées par le vecteur vide. Les souches de levures délétées ($\Delta drs2$ ou $\Delta cdc50$) ont été transformées pour exprimer DRS2, DRS2^{D560N} ou CDC50 seul, ou DRS2 avec DRS2 ou DRS2^{D560N} avec CDC50. DRS2 et DRS2^{D560N} ont été étiquetés avec une séquence codant Bad en position 3' (DRS2-Bad et DRS2^{D560N}-Bad), et CDC50 a été étiqueté en position 3' avec une séquence codant 10 histidines (CDC50-His₁₀). Le site de clivage (TEV ou THR) introduit entre la protéine et l'étiquette est noté. **A. et B.** Plusieurs dilutions des cultures de levures ont été déposées sur un milieu contenant 2% de galactose et 2% de fructose, pour une croissance à 28°C (à gauche) ou à 20°C (à droite), pendant 3-5 jours.

b) Mise au point de la purification du complexe Drs2p/Cdc50p en une étape

La première étape pour purifier des protéines membranaires est la solubilisation. Pour réaliser cette solubilisation, nous devons choisir un détergent, une concentration de détergent et un temps de solubilisation. Les choix concernant le détergent et la concentration de détergent à utiliser ont été guidés par l'étude de l'effet des détergents sur l'inactivation du complexe Drs2p/Cdc50p (Chapitre III, Fig. 20). Nous avons donc réalisé une cinétique de solubilisation de Drs2p/Cdc50p avec du DDM à un ratio détergent/protéines totales de 0,5/1 (g/g). Comme on peut le voir sur la Figure 4A, dans les conditions utilisées pour cette cinétique, la solubilisation est déjà maximale à 15 minutes (Fig. A,

comparer les puits « S » à 15, 120 ou 240 minutes de solubilisation) ; nous avons donc opté pour un temps de solubilisation de 15 minutes.

On remarque aussi que la solubilisation de Drs2p-Bad semble un peu meilleure lorsqu'on l'analyse avec la sonde avidine que lorsqu'on l'analyse avec l'anticorps α -Drs2p, dirigé contre le domaine situé entre les TM4 et TM5 de Drs2p (Fig. 4A). Ceci semble indiquer qu'une partie de la protéine Drs2p-Bad exprimée n'est pas biotinylée et que cette fraction non biotinylée est moins bien solubilisée que la fraction biotinylée.

Contrairement à sa version non tronquée, la version tronquée en C-terminal de Drs2p observée précédemment (Drs2p Δ Cter, Fig. 1A) est, quant à elle, totalement solubilisée (α -Drs2p, Fig. 4A, comparer les puits « T » et « S15 »). Comme déjà observé, seule la fraction glycosylée de Cdc50p-His₁₀ est solubilisée (Chapitre III, Fig. 19).

Après avoir défini le temps de solubilisation, nous avons cherché à déterminer le temps pendant lequel il est nécessaire d'incuber la protéine solubilisée avec la résine streptavidine pour que la fixation soit efficace. Comme le montre la Figure 4B, 120 minutes de fixation sont suffisantes pour retenir Drs2p-Bad sur la résine streptavidine (Fig. 4B ; α -Drs2p et sonde avidine). Cdc50p-His₁₀ est aussi retenue en partie à la résine, puisque sa concentration dans la fraction non retenue diminue avec le temps d'incubation, mais moins efficacement que Drs2p-Bad (Fig. 4B ; sonde histidine vs α -Drs2p). La fixation apparemment moins efficace de Cdc50p-His₁₀ à la résine streptavidine reflète vraisemblablement le fait que Cdc50p-His₁₀ est en partie liée (cf. Fig. 1C) avec la version tronquée de Drs2p, Drs2p Δ Cter, qui ne se fixe pas à la résine streptavidine.

Pour déterminer les conditions de clivage optimales des étiquettes Bad et His₁₀ par la protéase TEV, des aliquots de résine ont été prélevés au temps 0 et après différents temps d'incubation avec la protéase TEV, et déposés sur SDS-PAGE. Pour limiter les risques de protéolyse de Drs2p par les protéases de la levure et sachant que la protéase TEV n'est que trois fois moins active à 4°C qu'à 20°C (Nallamsetty *et al.*, 2004), nous avons réalisé l'incubation avec la protéase TEV à 4°C. Comme on s'y attend, les protéines naturellement biotinylées de la levure (Acc1p, Pyc1/2p et Arc1p; Fig. 4B ; sonde avidine), retenues sur la résine streptavidine au temps 0 (puits « R₀ », qui représente la résine avant incubation avec la TEV), ne se décrochent pas pendant l'incubation avec la TEV. Par contre, Drs2p-Bad (Fig. 4B ; α -Drs2p et sonde avidine) initialement fixée, est clivée au cours de l'incubation. Notons qu'en parallèle, Cdc50p-His₁₀ (Fig. 4B ; sonde histidine), initialement fixée elle aussi, est également clivée par la TEV puisque nous avons introduit un site TEV également entre Cdc50p et son étiquette.

Au bout d'une nuit d'incubation, le clivage des étiquettes Bad et His₁₀ est total (Fig. 4B ; puits « R_{nuit} »). Dans l'éluat (Fig. 4B ; puits « E1 »), on retrouve la protéase TEV (masse moléculaire de 27 kDa), détectée grâce à son étiquette de 6 histidines (cf le western blot avec la sonde histidine), et Drs2p. Mais dans cette expérience de mise au point où les incubations successives se sont déroulées sur presque trois jours, on voit deux polypeptides correspondant à Drs2p, d'une part Drs2p débarrassée de son étiquette (masse moléculaire de ~154 kDa), comme espéré, et d'autre part une version plus courte de Drs2p (masse moléculaire inférieure à 150 kDa). La version raccourcie de Drs2p observée ici dans cette expérience est encore différente de celle déjà observée et nommée Drs2p Δ Cter (Fig. 1, 4A, et 4B) : la nouvelle version tronquée est de mobilité électrophorétique plutôt moins élevée que Drs2p Δ Cter tel qu'on peut le voir déjà avant l'action de la protéase TEV (α -Drs2p, puits « R₀ » vs puits « NR »), et en outre elle semble être détectée par la sonde avidine (western blot correspondant). Ce nouveau fragment de Drs2p, *a priori* dérangerant, serait donc probablement le résultat d'une coupure protéolytique en N-terminal. Heureusement, comme on le verra plus loin, le

raccourcissement de la procédure de purification grâce aux mises au point effectuées au cours des premières expériences (à savoir une solubilisation de 15 minutes et une fixation à la résine streptavidine de 2 heures) permettra par la suite de limiter le temps d'exposition de Drs2p aux protéases de la levure et donc de diminuer la proportion de cette nouvelle version tronquée de Drs2p.

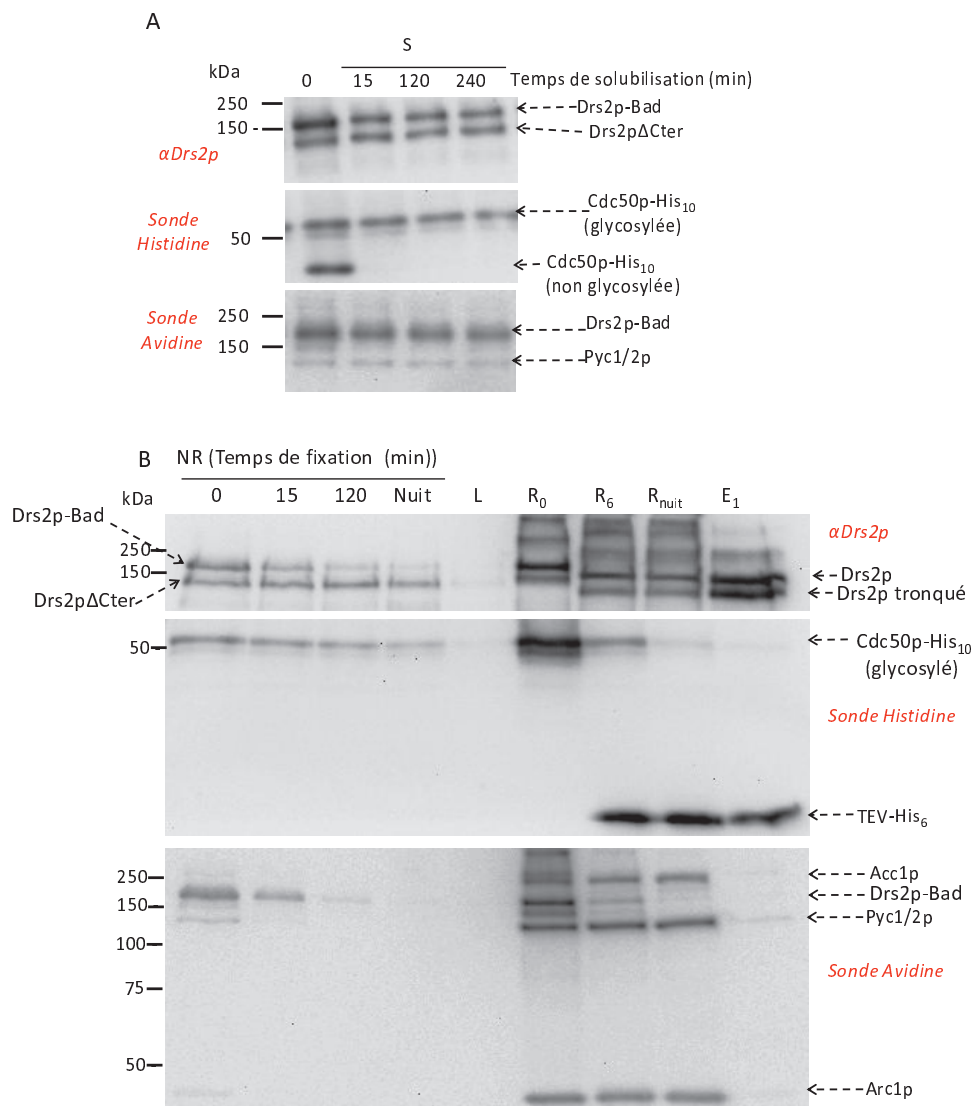


Figure 4. Mise au point de la purification du complexe Drs2p/Cdc50p par chromatographie d'affinité sur résine streptavidine à partir des membranes C3 : cinétique de solubilisation des membranes C3 (A) et cinétique de fixation de Drs2p-Bad à la résine streptavidine (B).

A. Analyse, par western-blot, de la cinétique de solubilisation de Drs2p-Bad et Cdc50p-His₁₀ par le DDM à un ratio DDM/protéines totales de 0,5 g/g. Les membranes C3 contenant Drs2p-Bad et Cdc50p-His₁₀ ont été diluées à 2 mg/mL pour la solubilisation. La solubilisation a eu lieu pendant des temps allant jusqu'à 240 minutes, à 4°C sous agitation lente, selon la procédure décrite dans le Chapitre « Matériel et Méthodes » pour les purifications en une seule étape sur résine streptavidine. Des aliquots ont été prélevés à différents temps pour établir la cinétique de solubilisation. Ces aliquots ont été centrifugés à 88000 g_{av} pendant 1 heure à 4°C, afin de séparer la fraction solubilisée de la fraction insoluble. 0,5 μ g de fraction totale (« T ») a été déposé ainsi qu'un volume équivalent du solubilisé (« S ») après 15, 120 ou 240 minutes de solubilisation. **B.** Analyse par western-blot de la cinétique de fixation à la résine streptavidine et de la purification du complexe Drs2p/Cdc50p. La fraction

solubilisée pendant 240 minutes a été mise en contact avec la résine streptavidine pendant 6 heures ou toute une nuit à 4°C, avec un ratio résine/protéines cibles (Drs2p-Bad) de 1 mL/4 mg. La fraction non retenue a été collectée après différents temps d'incubation, par centrifugation de la résine à 500 g pendant 3 minutes et à 4°C (Eppendorf 5430, rotor F35-6-30). La procédure de lavage et d'élution (en absence de PS dans les tampons de lavage) a ensuite été appliquée sur le solubilisé incubé toute une nuit avec la résine, en suivant le protocole décrit dans le Chapitre « Matériel et Méthodes ». « S » : solubilisé après 240 minutes de solubilisation. « NR » : non retenu après 15, 120 minutes ou une nuit d'incubation avec la résine streptavidine. « L » : lavages. « R₀ » : résine après lavage et avant incubation avec la protéase TEV. « R₆ » et « R_{nuit} » : résine après 6 heures ou une nuit d'incubation avec la protéase TEV. « E₁ » : éluat 1. Acc1p : acétyl-CoA carboxylase, Pyc1/2p : pyruvate carboxylase, Arc1p : complexe Acyl-ARN. La détection de Drs2p-Bad a été effectuée à l'aide d'une sonde avidine ou de l'anticorps α -Drs2p alors que la détection de Cdc50p-His₁₀ a été faite à l'aide d'une sonde histidine.

c) Protocole final de purification du complexe Drs2p/Cdc50p en une seule étape

Nous avons réalisé les expériences suivantes en tenant compte des résultats obtenus au cours de l'optimisation du protocole, et consistant principalement à raccourcir la procédure de purification. En outre, sachant que le ratio de 0,5 g/g de DDM/protéines totales utilisé jusqu'ici pour la solubilisation n'était que tout juste suffisant pour la solubilisation des membranes C3 (tests de diffusion de lumière non montrés), nous avons décidé d'utiliser un ratio DDM/protéines totales un peu plus élevé (1 g/g), mais qui n'entraîne cependant pas d'inactivation du complexe Drs2p/Cdc50p (Chapitre III.1, Fig. 20D).

Dans cette expérience, comme on peut le voir sur les western-blot de la Figure 5 (C&D), seulement une petite partie de Drs2p-Bad entier a été solubilisée, alors que la quasi-totalité de la version tronquée (comparer puits « T_{DDM} » et « S », α -Drs2p) et de Cdc50p glycosylée (sonde histidine) l'ont été. Si on regarde maintenant le puits correspondant à ce qui n'a pas été retenu par la streptavidine (puits « NR »), on voit que la fixation de Drs2p-Bad à la résine streptavidine a été quasi-totale après 2 heures d'incubation, tandis que la version tronquée de Drs2p, Drs2p Δ Cter, ne s'est pas fixée (voir α -Drs2p). La protéine Cdc50p glycosylée ne s'est que partiellement fixée, pour les raisons déjà discutées. Avec la sonde avidine ou le bleu de Coomassie, on peut voir que les protéines naturellement biotinylées de la levure se sont elles aussi fixées sur la résine « R₀ ». Le puits « R₀ » confirme aussi la fixation d'une partie au moins de Cdc50p-His₁₀ (bleu de Coomassie et sonde histidine). On constate également que la version tronquée en N-terminal observée lors de nos mises au point est maintenant quasiment inexistante (puits « R₀ », sonde avidine et α -Drs2p) ; on peut supposer que cette réduction de la protéolyse est due au raccourcissement du protocole de purification.

On remarque aussi dans le puits « R₀ » (bleu de Coomassie et α -Drs2p) la présence de polypeptides de migration électrophorétique plus lente que Drs2p-Bad, identifiés par l'anticorps dirigé contre Drs2p mais pas par la sonde avidine, et qui correspondent peut-être à des agrégats de Drs2p mal biotinylé.

Après action de la TEV, l'élution est presque totale puisqu'on retrouve peu de Drs2p sur la résine après élution (puits « R* », α -Drs2p et bleu de Coomassie). L'éluat, après coloration au bleu de Coomassie, ne semble contenir que Drs2p (et ses agrégats), Cdc50p et la protéase TEV.

Par comparaison avec un dépôt de réticulum sarcoplasmique qui contient la protéine Serca1a native en quantité connue (puits « RS 0,5 µg », bleu de Coomassie), nous avons estimé avoir obtenu 0,5 µg de Drs2p dans 5 µL de l'éluat 1, soit 600 µL d'éluat 1 à 0,1 mg/ml ou 60 µg de Drs2p. En tenant compte des éluats 2 et 3, nous obtenons 80 µg de Drs2p. Comme cet essai a été effectué à partir de 20 mL de fraction membranaire C3 à 2 mg/mL de protéines totales, et sachant que Drs2p-Bad représente 3 % des protéines de la fraction membranaire C3, nous sommes donc partis de 1200 µg de Drs2p-Bad : le rendement de purification est donc de 7 %. Comme à partir d'1 litre de culture en Fernbach, nous obtenons ~35 g de levures qui aboutissent à l'obtention de ~250 mg de protéines totales dans les membranes C3 (dont Drs2p-Bad représente ~7 mg), pour 1L de culture il devrait être possible d'obtenir environ 0,5 mg de Drs2p après purification par chromatographie d'affinité sur résine streptavidine.

Un suivi de la formation du dérivé phosphorylé par le $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ a été réalisé au cours de cette purification. Sur la Figure 5E, on voit que les deux tiers de la phosphorylation vanadate-dépendante ont été solubilisés (comparer les puits « T_{DDM} » et « S »), et que la moitié seulement des protéines solubilisées correspondantes s'est fixée à la résine, l'autre moitié étant retrouvée dans le non retenu (comparer les puits « S » et « NR »). Il est probable que le dérivé phosphorylé mesuré dans le non retenu provient de la version tronquée en C-terminal de Drs2p-Bad, associée à Cdc50p-His₁₀, et qui ne se fixe pas à la résine (Fig. 1C et 4B). En effet, nous avons par la suite obtenu la certitude que le fragment Drs2pΔCter était phosphorylable par l'ATP (voir Chapitre III.3, Fig. 1).

Comme vu précédemment, le niveau de phosphorylation de Drs2p-Bad dans les membranes C3 est d'environ 3 pmol de ^{32}P /0.1 mg de protéines totales (Fig. 5E). Ceci équivaut à ~3 pmol/3 µg de Drs2p (Drs2p enrichie à 3% dans les membranes C3). Comparons maintenant cette valeur à celle obtenue pour le complexe Drs2p/Cdc50p purifié : dans ce dernier cas, on évalue la concentration de Drs2p dans l'éluat « E1 », par comparaison avec des quantités de Serca1a connues, à environ 0,1-0,2 mg/mL et on peut donc estimer le niveau de phosphorylation à ~10 pmol/5-10 µg de Drs2p. Il apparaît donc que le complexe Drs2p/Cdc50p ne s'est pas fortement inactivé au cours de cette étape de purification.

La purification présentée ici a été réalisée en présence de phosphatidylsérine (POPS), que l'on a ajoutée dans l'espoir d'éviter la délipidation par le DDM et donc l'inactivation possible du complexe Drs2p/Cdc50p pendant les étapes de lavage. Un essai réalisé en absence de POPS pendant les étapes de lavage a été réalisé ; il montre cependant peu de changement concernant la quantité et la qualité du complexe obtenu.

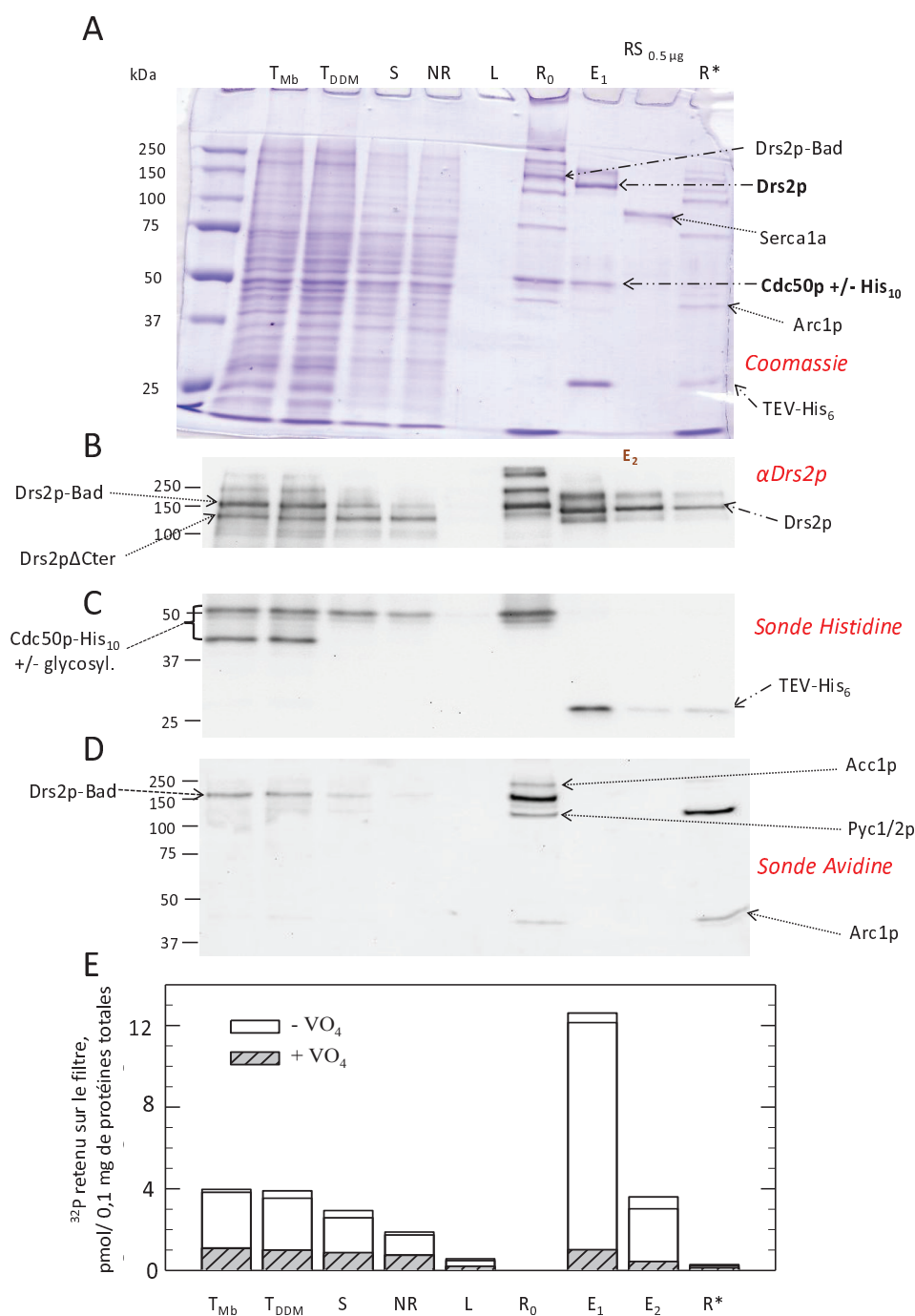


Figure 5. Purification du complexe Drs2p/Cdc50p par chromatographie d'affinité sur résine streptavidine, en présence de POPS.

Les membranes C3 contenant Drs2p-Bad et Cdc50p-His₁₀ ont été diluées à 2 mg/mL dans le tampon SSR et solubilisées pendant 15 minutes, à 4°C, sous agitation lente. Le ratio DDM/protéines totales était de 1/1 (g/g). Le complexe Drs2p-Bad/Cdc50p-His₁₀ a été purifié comme décrit dans le Chapitre « Matériel et Méthodes ». Brièvement, le solubilisé a été mis en contact avec la résine streptavidine pendant 2 heures à 4°C avec un ratio résine/protéines cibles (Drs2p-Bad) de 1 mL/4 mg. Le non retenu a été récupéré par centrifugation et la résine a alors été lavée 3 fois, à 4°C, par 3 volumes de résine avec le tampon SSR supplémenté de 0,5 mg/mL de DDM, de 0,025 mg/mL de POPS et de 1 mM de PMSF. Le complexe Drs2p/Cdc50p a été élué avec la protéase TEV, dans un tampon contenant 0,025 mg/mL de POPS, 0,5 mg/mL de DDM et 0,1 mg/mL de TEV. « T » : fraction totale

avant (« T_{Mb} ») ou après (« T_{DDM} ») incubation pendant 15 minutes avec le DDM. « S » : solubilisat. « NR » : non retenu. « L » : lavage. « R_0 » : résine après lavage et avant incubation avec la protéase TEV. « E_1 » et « E_2 » : premier et deuxième éluats recueillis après coupure par la protéase TEV. « R^* » : résine après élution par la TEV. **A.** 5 μ L de chacune des fractions a été déposé sur SDS-PAGE, sauf pour la fraction « L », pour laquelle 0,75 μ L a été déposé. Le gel a été coloré au bleu de Coomassie. **B, C.** 1 μ L de chacune des fractions a été déposé sur gel pour analyse par western-blot, sauf pour la fraction « L », pour laquelle 0,15 μ L a été déposé. L'anticorps dirigé contre Drs2p (α -Drs2p) ou la sonde histidine a été utilisé pour la révélation. **D.** 0,2 μ L de chacune des fractions a été déposé pour analyse par western-blot, sauf pour la fraction « L », pour laquelle 0,04 μ L a été déposé. La sonde avidine a été utilisée pour la révélation. Acc1p : acétyl-CoA carboxylase ; Pyc1/2p : pyruvate carboxylase ; Arc1p : complexe Acyl-ARN. **E.** Pour les mesures de phosphorylation, toutes les fractions ont été diluées 4 fois dans le tampon A (50 mM Mops-Tris pH 7, 100 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$) supplémenté de 100 μ M de $CaCl_2$, de 1 mM d'EGTA et de DDM afin d'obtenir une concentration finale de 5 mg de DDM/mL. Du vanadate (VO_4) à 1 mM a été ajouté quand on le souhaitait. La phosphorylation a été déclenchée par l'addition de $[\gamma\text{-}^{32}P]ATP$ à une concentration finale de 0,5 μ M, puis la réaction a été stoppée après 25 secondes d'incubation avec l'ATP radioactif par addition d'acide (500 mM TCA supplémenté de 30 mM H_3PO_4). Après précipitation pendant 25 minutes dans la glace, les protéines ont été filtrées et la radioactivité retenue sur le(s) filtre(s) a été mesurée par scintillation.

d) Purification du complexe Drs2p^{D560N}-Bad/Cdc50p-His₁₀ par chromatographie d'affinité sur résine streptavidine

Afin d'avoir un contrôle négatif pour la caractérisation fonctionnelle du complexe Drs2p/Cdc50p purifié, nous avons aussi soumis les membranes C3 contenant la protéine mutée Drs2p^{D560N}-Bad (et Cdc50p-His₁₀) à une étape de purification par chromatographie d'affinité sur résine streptavidine. Malheureusement, comme on peut le voir sur la Figure 6, Drs2p^{D560N}-Bad et Cdc50p-His₁₀ se solubilisent très mal (Fig. 6B et 6C, comparer les puits « T_{DDM} » et « S »). Une très petite fraction de Drs2p^{D560N}-Bad et de la protéine Cdc50p glycosylée se fixe tout de même à la résine streptavidine puisque l'on peut détecter les 2 protéines dans le puits « R_0 » (Fig. 6B et 6C).

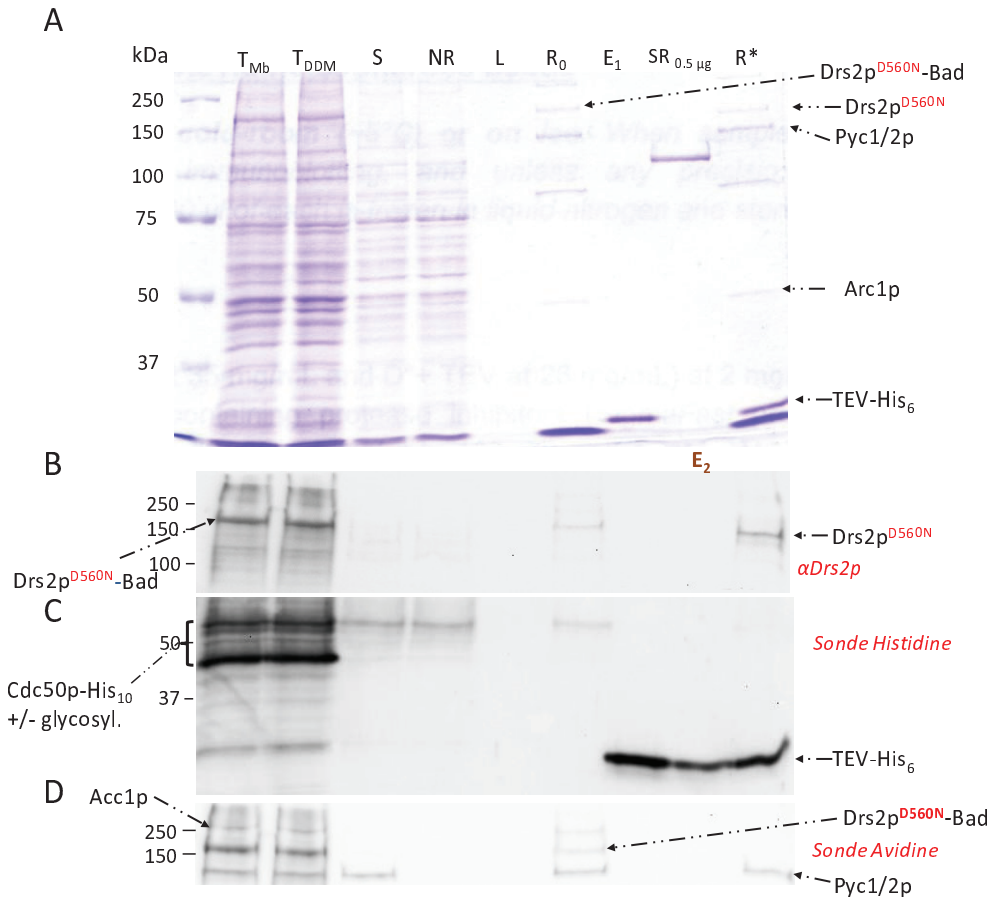


Figure 6. Purification du complexe Drs2p^{D560N}/Cdc50p par chromatographie d'affinité sur résine streptavidine
Drs2p^{D560N}-Bad et Cdc50p-His₁₀ ont été purifiées par affinité sur résine streptavidine, en une seule étape, selon le protocole déjà décrit pour la purification du complexe avec Drs2p-Bad sauvage sauf que le ratio résine/protéine cible était ici de 1 mL/2 mg. « T » : fraction totale avant (« T_{Mb} ») ou après (« T_{DDM} ») incubation pendant 15 minutes avec le DDM. « S » : solubilisé. « NR » : non retenu. « L » : lavage. « R₀ » : résine après lavage et avant incubation avec la protéase TEV. « E₁ » et « E₂ » : premier et deuxième éluats recueillis après coupure par la protéase TEV. « R » : résine après élution par la TEV. **A.** 5 μL de chacune des fractions a été déposé sur SDS-PAGE, sauf pour la fraction « L », pour laquelle 0,75 μL a été déposé. Le gel a été coloré au bleu de Coomassie. **B,** **C.** 1 μL de chacune des fractions a été déposé sur gel pour analyse par western-blot, sauf pour la fraction « L », pour laquelle 0,15 μL a été déposé. L'anticorps dirigé contre Drs2p (α-Drs2p) ou la sonde histidine a été utilisé pour la révélation. **D.** 0,2 μL de chacune des fractions a été déposé pour analyse par western-blot, sauf pour la fraction « L », pour laquelle 0,04 μL a été déposé. La sonde avidine a été utilisée pour la révélation. Acc1p : acétyl-CoA carboxylase ; Pyc1/2p : pyruvate carboxylase ; Arc1p : complexe Acyl-ARN.*

e) Analyse par filtration sur gel en HPLC des éluats issus de la purification sur résine streptavidine

Afin de vérifier si Drs2p et Cdc50p forment toujours un complexe stable après purification sur résine streptavidine, mais aussi pour essayer d'augmenter la pureté de la fraction finale, les éluats issus de la purification sur résine streptavidine (en présence de POPS) ont été déposés sur une colonne de filtration sur gel. Cette étape de purification supplémentaire doit permettre de séparer le complexe de ses agrégats éventuels et de conférer à la protéine purifiée les qualités d'homogénéité souhaitables pour les essais de cristallisation. Le tampon d'élution contenait ici du DDM et de la PS. Il faut noter que cette étape de filtration sur gel s'est avérée cruciale pour la cristallisation de Serca1a exprimée dans la levure au laboratoire (Jidenko et al., 2005).

De façon préliminaire, une calibration de la colonne a été réalisée avec différentes protéines de poids moléculaires connus, de même qu'un contrôle avec la protéine Serca1a du réticulum sarcoplasmique de lapin, solubilisée. Sur la calibration (Fig. 7A), le premier pic observé correspond à la thyroglobuline (masse moléculaire de 670 kDa, volume d'élution : 6,25 mL), le second pic correspond à l'IgG (masse moléculaire de 150 kDa, volume d'élution : 8,4 mL), le troisième pic correspond à l'ovalbumine (masse moléculaire de 45 kDa, volume d'élution : 9,08 mL), le quatrième pic correspond à la myoglobine (masse moléculaire de 24 kDa, volume d'élution : 11,07 mL) et le dernier pic correspond à la vitamine B12 (masse moléculaire de 12 kDa, volume d'élution : 12,8 mL). Pour le réticulum sarcoplasmique, on observe un pic majoritaire pour les fractions éluées entre 7,5 à 8,25 mL (Fig. 7B). Ce pic correspond à la protéine Serca1a, comme le montre le western-blot réalisé à partir des fractions collectées au cours de la chromatographie (Fig. 7B). Le pic obtenu pour un volume d'élution de 9-9,5 mL représente les micelles mixtes détergents/lipides (le Maire et al., 2008).

Après injection de l'éluat contenant les protéines Drs2p et Cdc50p purifiées sur résine streptavidine, le chromatogramme obtenu présente 3 pics (Fig. 7C) : le premier pic (fractions éluées entre 5,5 et 6 mL) correspond probablement au complexe agrégé (un pic similaire, correspondant à des agrégats, est observé dans le cas de Serca1a surexprimée en levure ; (Jidenko et al., 2005)), alors que le dernier pic (fractions éluées entre 8,75 et 9,25 mL) correspond probablement aux micelles mixtes (détergent et lipides). Le deuxième pic contient Drs2p et Cdc50p (fractions éluées entre 6,25 et 7,25 mL), comme le montrent des gels colorés au nitrate d'argent (Fig. 7C) (ou révélés par western-blot dans le cas de Drs2p ; comme nous n'avons pas d'anticorps spécifiquement dirigé contre Cdc50p, il n'est pas possible de détecter Cdc50p par western-blot après l'action de la TEV). Ceci indique que les deux protéines restent associées après purification et lors de la filtration sur gel en présence de DDM et PS. Comme le montre la coloration au nitrate d'argent, la TEV semble avoir été éliminée au cours de l'étape de filtration sur gel.

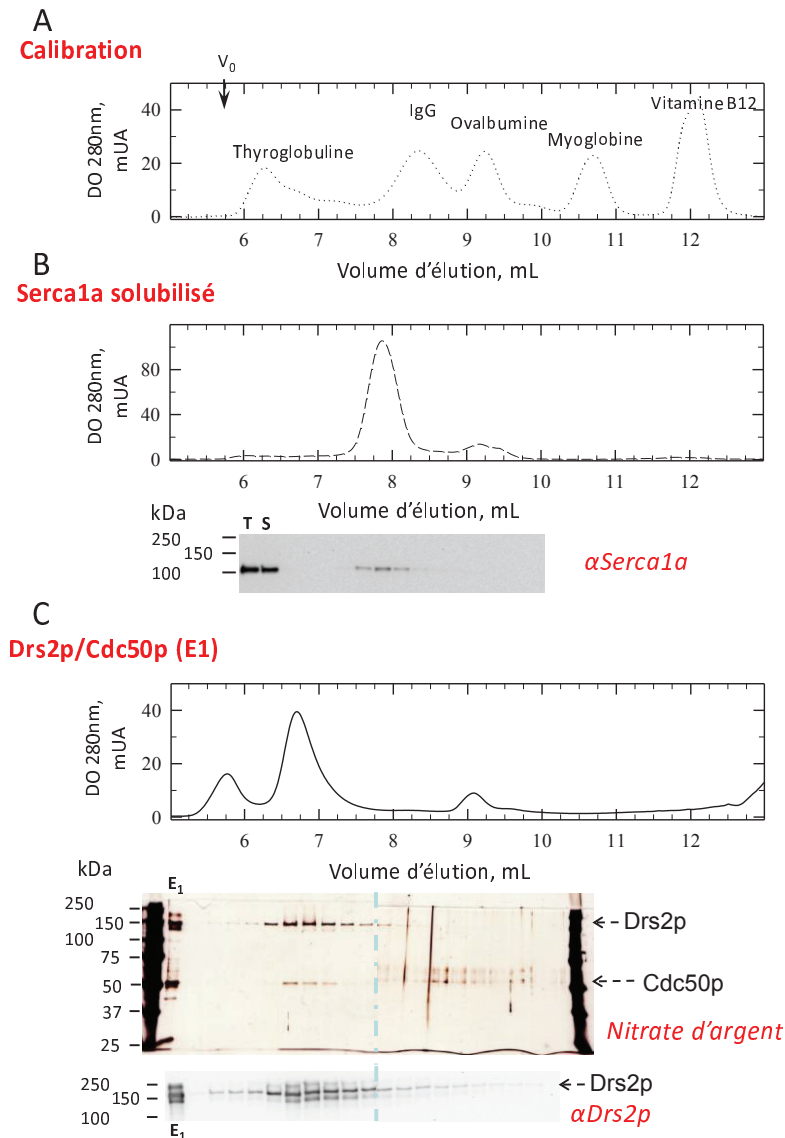


Figure 7. Purification du complexe Drs2p/Cdc50p par filtration sur gel en HPLC, en présence de DDM et de phosphatidylsérine, à partir de l'éluat E1 issu de la purification sur résine streptavidine.

Le tampon utilisé pour équilibrer la colonne de gel filtration était le tampon (20 mM TES-NaOH pH 7, 100 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$ et 0,5 mM $CaCl_2$) supplémenté de 0,5 mg/mL de DDM et de 0,025 mg/mL de POPS. Dans tous les cas, des fractions de 250 μ L ont été collectées. **A.** Les marqueurs (200 μ L) ont été injectés à 1 mg/mL. **B.** Pour contrôle, des membranes de réticulum sarcoplasmique à 0,5 mg/mL ont été solubilisées pendant 5 minutes avec un ratio 10/1 (g/g) de DDM/protéines totales et le surnageant du solubilisé (200 μ L) a ensuite été injecté. 0,05 μ L de chaque fraction a été déposé sur SDS-PAGE pour analyse du contenu de ces fractions par western-blot. L'anticorps utilisé était l'anticorps α -Serca1a (79B). T : réticulum sarcoplasmique avant solubilisation. S : fraction solubilisée. **C.** 150 μ L de l'éluat E1 issu de la purification en une seule étape, sur résine streptavidine, du complexe Drs2p/Cdc50p, ont été injectés. 2,5 μ L de l'éluat E1 a été déposé sur SDS-PAGE pour coloration par le nitrate d'argent ou pour une immunodétection par l'anticorps α -Drs2p. 5 μ L des fractions collectées au cours de la filtration sur gel ont été déposés sur SDS-PAGE pour coloration par le nitrate d'argent ou pour une immunodétection par l'anticorps α -Drs2p. E₁ : éluat 1 collecté à l'issue de la purification.

f) Échange du DDM par le C₁₂E₈ sur colonne streptavidine et purification d'un complexe inhibé par le fluorure de béryllium.

Afin de se rapprocher des conditions ayant déjà permis l'obtention de la structure de Serca1a par nos collègues du département de Biologie Moléculaire de l'Université d'Aarhus au Danemark (Jidenko et al., 2005), nous avons testé l'échange du DDM par le C₁₂E₈ au cours de l'étape de lavage de la résine streptavidine, tout en craignant cependant que le C₁₂E₈ ne soit plus dénaturant que le DDM (cf. Fig. 20 Chapitre III). Or, du point de vue des risques de dénaturation par le détergent, les composés fluorés ont été d'une grande utilité pour parvenir à obtenir les structures de Serca1a en absence de calcium (Olesen et al., 2007; Toyoshima et al., 2007), car ils protègent cette dernière d'une inactivation irréversible par le C₁₂E₈ (Yamasaki et al., 2002). C'est pourquoi nous avons aussi réalisé un essai pour lequel le complexe Drs2p/Cdc50p a été initialement inhibé par le fluorure de béryllium dans les membranes C3, solubilisé par le DDM, fixé sur la résine, mais finalement lavé et élué en présence de C₁₂E₈. Ces différentes purifications ont-elles aussi été réalisées en la présence additionnelle de PS pendant les étapes de lavage et d'éluion.

La Figure 8A montre le résultat des purifications effectuées dans ces différentes conditions. Une purification en condition contrôle, identique à celle présentée dans la Figure 5, a été incluse. Comme on peut le voir sur le gel coloré au bleu de Coomassie (Fig. 8A), et bien que le rendement de purification semble légèrement plus faible lorsque le DDM est échangé par le C₁₂E₈, des quantités appréciables du complexe Drs2p/Cdc50p sont obtenues dans les éluats quelles que soient les conditions utilisées. Ceci indique que le C₁₂E₈ ne conduit pas à l'agrégation du complexe et qu'il n'empêche pas la coupure par la protéase TEV. De plus, le complexe entre Drs2p et Cdc50p est maintenu, que ce soit en présence de C₁₂E₈ ou du fluorure de béryllium. La Figure 8B montre, quant à elle, que l'échange du DDM par le C₁₂E₈ conduit à la purification d'un complexe qui n'est plus phosphorylable par le [γ -³²P]ATP ; ce résultat n'est pas surprenant, au vu de la rapide inactivation du complexe en présence de C₁₂E₈ que nous avons déjà observée (Chapitre III.1, Fig. 20). Le fluorure de béryllium a inhibé la formation de dérivé phosphorylé pour le complexe Drs2p/Cdc50p, comme nous l'avions précédemment observé (Chapitre III.1, Fig. 17), et il n'y a donc pas d'espoir de retrouver du dérivé phosphorylé après purification. Mais peut-être cette inhibition fonctionnelle a-t-elle protégé le complexe Drs2p/Cdc50p d'une dénaturation structurale irréversible par le C₁₂E₈ : si c'était le cas, alors ces conditions seraient potentiellement intéressantes pour démarrer des essais de cristallisation.

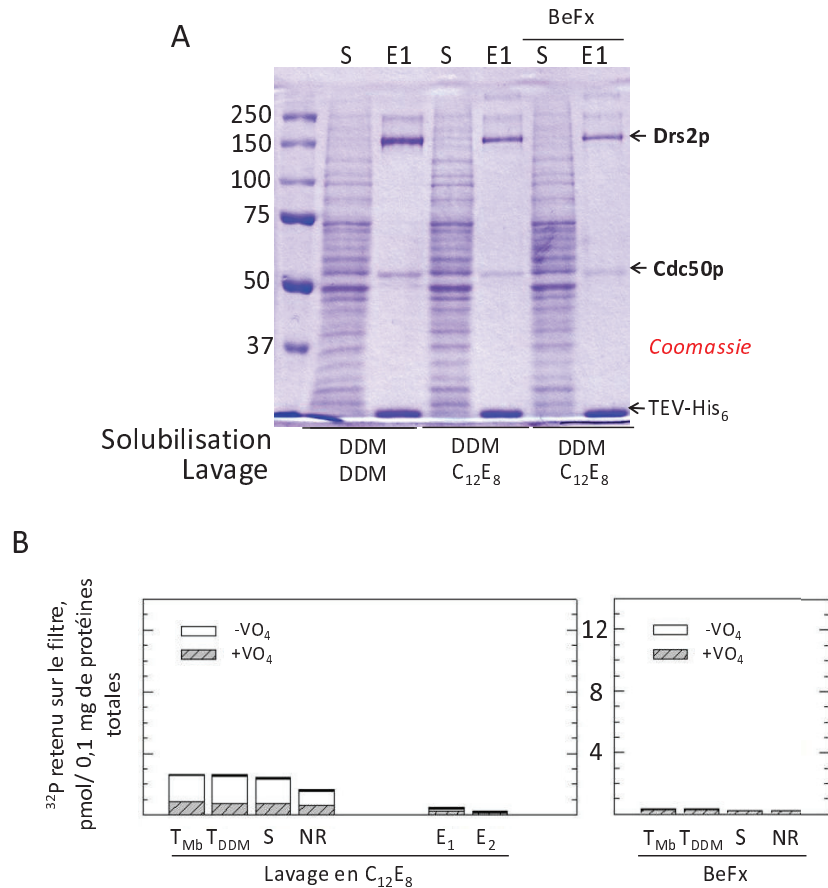


Figure 8. Purification du complexe Drs2p/Cdc50p en $C_{12}E_8$, éventuellement après son inhibition par le fluorure de béryllium.

La purification s'est déroulée dans les conditions de l'expérience décrite à la Fig. 5, avec les modifications suivantes. Dans le cas de la purification en présence de $C_{12}E_8$, les tampons de lavage et d'éluat contenaient 0,5 mg/mL de $C_{12}E_8$. Dans le cas de la purification du complexe inhibé par le fluorure de béryllium, 50 μ M de $BeCl_2$ et 1 mM de KF ont d'abord été ajoutés aux membranes C3 diluées à 2 mg/mL dans le tampon SSR, puis aux tampons tout au long de la purification. De plus, dans ce cas également, les tampons de lavage et d'éluat contenaient 0,5 mg/mL de $C_{12}E_8$. « T » : fraction totale avant (« T_{Mb} ») ou après (« T_{DDM} ») incubation pendant 15 minutes avec le DDM. « S » : solubilisat. « NR » : non retenu sur la résine streptavidine. « E_1 » et « E_2 » : premier et deuxième éluats, recueillis après coupure par la protéase TEV. VO_4 : vanadate. 5 μ L du solubilisat et 4,5 μ L de l'éluat 1 ont été déposés sur SDS-PAGE et le gel a ensuite été coloré au bleu de Coomassie. Pour les mesures de phosphorylation, toutes les fractions ont été diluées 4 fois (12 fois pour les éluats mais la mesure a été multiplié par 3 sur la Figure) dans le tampon A (50 mM Mops-Tris pH 7, 100 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$) supplémenté de 100 μ M de $CaCl_2$, de 1 mM d'EGTA et de DDM afin d'obtenir une concentration finale de 5 mg de DDM/mL. Du vanadate (VO_4) a été ajouté à 1 mM, lorsque souhaité. La phosphorylation a été déclenchée par l'addition de [γ - ^{32}P]ATP à une concentration finale de 0,5 μ M, puis la réaction a été stoppée après 25 secondes d'incubation avec l'ATP radioactif par addition d'acide (500 mM TCA supplémenté de 30 mM H_3PO_4). Après précipitation pendant 25 minutes dans la glace, les protéines ont été filtrées et la radioactivité associée au filtre a été mesurée par scintillation liquide.

g) Mesures d'activité ATPasique après purification

La mesure de la vitesse d'hydrolyse de l'ATP par le complexe Drs2p/Cdc50p serait une preuve irréfutable du caractère fonctionnel du complexe après purification. Une tentative dans ce sens s'était révélée infructueuse lorsqu'elle avait été réalisée sur des membranes C3 exprimant le complexe (Chapitre III.1). Etant donné que les contaminants présents dans les membranes C3 ont maintenant été éliminés dans leur grande majorité, nous avons tenté de mesurer une telle activité après purification.

Des cinétiques de libération de phosphate inorganique ont été réalisées à partir des fractions purifiées sur résine streptavidine en présence de PS (Drs2p/Cdc50p actif ou Drs2p^{D560N}/Cdc50p inactif). Comme le montre la Figure 9A, l'incubation de la fraction Drs2p/Cdc50p à 30°C en présence de 1 mM d'ATP, dans des conditions « de base » (triangles blancs), conduit à une libération de Pi à peu près linéaire au cours du temps (~0,1 μ mol d'ATP hydrolysé/mg de protéines/min). L'effet de nos inhibiteurs traditionnels a été testé : de façon inattendue, cette hydrolyse de l'ATP n'est pas inhibée par le VO₄ mais en revanche, elle est totalement inhibée par le fluorure de béryllium (carrés blancs). Les mêmes mesures de libération de Pi sur la fraction purifiée Drs2p^{D560N}/Cdc50p montrent une activité ATPasique « de base » similaire (Fig. 9B, triangles blancs), elle aussi inhibée par le fluorure de béryllium (Fig. 9B, carrés blancs) et indépendante du VO₄ (non montré). Il apparaît donc que cette activité « de base » d'hydrolyse de l'ATP est hélas indépendante de Drs2p et provient donc probablement d'un contaminant résiduel, présent dans les fractions purifiées.

Cependant, comme le PI(4)P stimule significativement la vitesse de déphosphorylation en présence de PS (Fig. 21, Chapitre III.1), nous avons testé l'effet du PI(4)P sur la cinétique d'hydrolyse de l'ATP. Comme on peut le voir sur la Figure 9A, en présence de PI(4)P on observe une accélération très significative de la vitesse d'hydrolyse de l'ATP par Drs2p sauvage (triangles noirs). Cette accélération par le PI(4)P est spécifique de Drs2p actif puisqu'on ne l'observe pas pour le mutant D560N (cercles noirs, Fig. 9B). Des concentrations supérieures en PI(4)P ne stimulent pas davantage l'hydrolyse de l'ATP (cercles noirs), suggérant que la concentration utilisée ici est largement suffisante par rapport à l'affinité relative de Drs2p pour le PI(4)P (Fig. 9A). De nouveau, en présence de PI(4)P, l'hydrolyse de l'ATP par le complexe Drs2p/Cdc50p est fortement inhibée par le fluorure de béryllium (carrés noirs) mais seulement de façon marginale par le VO₄ (losanges noirs).

Comme le C₁₂E₈ s'est révélé être fortement stimulateur de la vitesse de déphosphorylation du complexe Drs2p/Cdc50p avant purification (Fig. 20, Chapitre III.1), nous nous sommes demandé si cet effet se traduirait après purification par une stimulation de la vitesse d'hydrolyse de l'ATP. Au contraire, en présence de PI(4)P, l'ajout de concentrations croissantes de C₁₂E₈ a diminué l'activité ATPasique (carrés noirs et losanges noirs : 1 et 4 mg/mL C₁₂E₈, Fig. 9C). Il est cependant possible que ce soient les temps d'incubation relativement longs (jusqu'à 2 heures) en présence de C₁₂E₈ nécessaires pour cette mesure d'activité ATPasique qui aient conduit à la dénaturation irréversible du complexe Drs2p/Cdc50p (voir aussi Fig. 20, Chapitre III.1).

Pour calculer l'activité spécifique en présence de PI(4)P du complexe Drs2p/Cdc50p purifié, on a réalisé une gamme étalon avec différentes concentrations de phosphate inorganique, à partir de laquelle on a pu convertir les variations d'absorbance à 850 nm en concentrations de Pi libéré. Par ailleurs la quantité de Drs2p dans l'éluat collecté après purification sur résine streptavidine (Fig. 9D) a été évaluée, sur un SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie, par comparaison avec des quantités connues de Serca1a native. De cette manière, la vitesse d'hydrolyse de l'ATP par notre complexe purifié a été estimée à environ 0,5 μ mol d'ATP hydrolysé/mg Drs2p/min, en présence de PS et de PI(4)P.

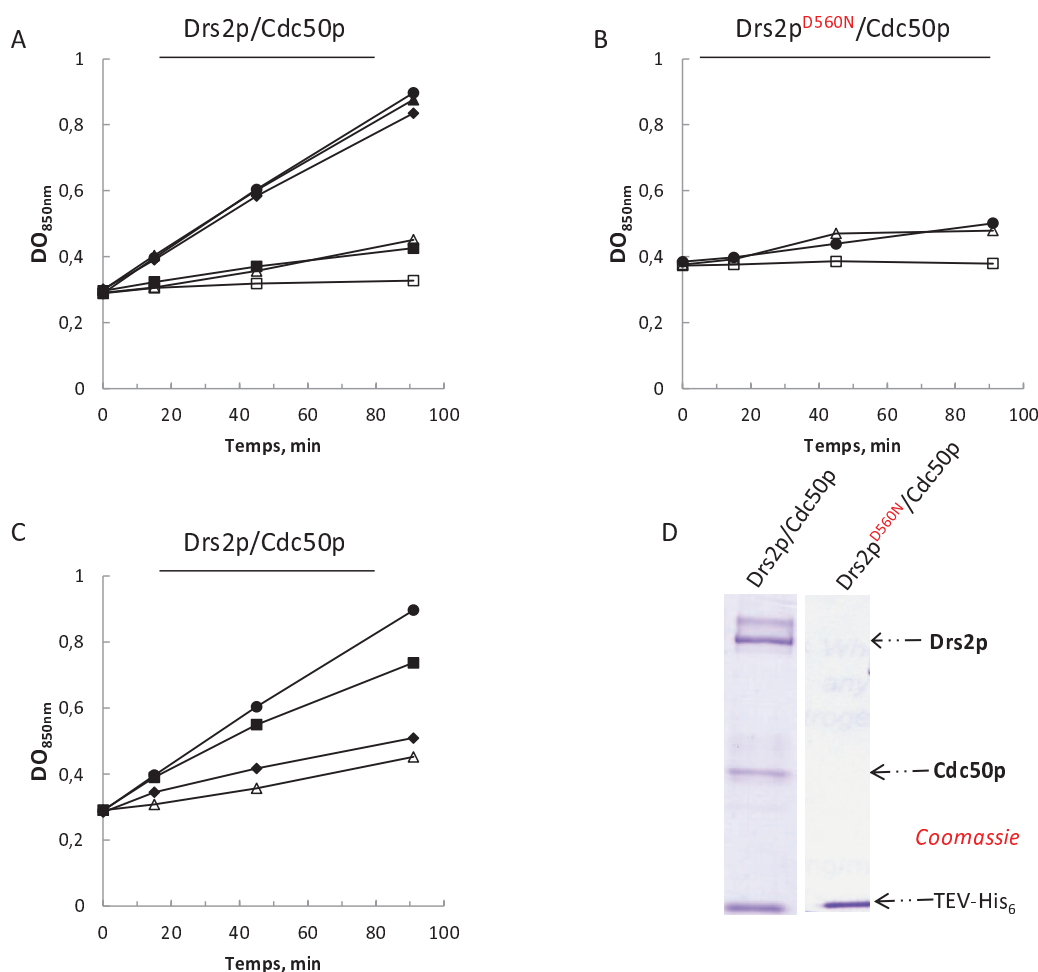


Figure 9. Activités ATPasiques des éluats 1 issus de la purification des complexes Drs2p/Cdc50p et Drs2p^{D560N}/Cdc50p.

Les éluats 1 de la purification du complexe Drs2p/Cdc50p ou du complexe Drs2p^{D560N}/Cdc50p ont été mis en présence de DDM à 1 mg/mL et de 0,025 mg/mL de POPS (panneau A, B et C; triangles blancs), en présence ou en absence de 0,05 mg/mL de PI(4)P (panneaux A, B et C; symboles noirs) (ou 0,025 mg/mL; panneau A; triangles noirs). 1 ou 4 mg/mL de C₁₂E₈ (carrés noirs ou losanges noirs, respectivement; panneau C) ou 1 mM de vanadate (losanges noirs; panneau A) ou 1 mM de KF + 50 μ M de BeCl₂ (carrés blancs, panneau A et C; carrés noirs, panneau A) ont aussi été ajoutés, si souhaité. À t=0, 1 mM de Mg²⁺-ATP a été ajouté pour initier la réaction, en présence d'un système régénérateur d'ATP (1 mM PEP + 0,05 mg/mL PK). La réaction a été arrêtée à différents temps par 3,5 % de SDS. On a ajouté ensuite le mélange ammonium molybdate/acide ascorbique, et la DO a été mesurée à 850 nm après 2 heures d'incubation.

h) Discussion

L'avantage principal d'une purification par affinité en tandem aurait été d'obtenir, après les 2 étapes, uniquement le complexe Drs2p/Cdc50p puisque, tout d'abord, on aurait sélectionné Cdc50p-His₁₀ seul ou en complexe avec Drs2p-Bad via l'étiquette de 10 histidines, puis uniquement Drs2p-Bad/Cdc50p-His₁₀ par l'intermédiaire de l'étiquette Bad. De plus, la première étape par Ni²⁺-NTA nous aurait permis d'éliminer une grande partie des protéines naturellement biotinylées de la levure, et par conséquent de réduire la quantité de résine streptavidine nécessaire pour la purification. Malheureusement, la première étape de cette purification en tandem n'a abouti qu'à un rendement de purification de 14%. Ce faible rendement nous a contraints à envisager une nouvelle approche, rendue possible par le probable excès de Cdc50p-His₁₀ par rapport à Drs2p-Bad dans les membranes C3. Cette approche a consisté à purifier le complexe Drs2p/Cdc50p en une seule étape, par affinité sur résine streptavidine.

En chemin, nos résultats ont montré qu'il devait exister dans la séquence de Drs2p un site de coupure par la thrombine non prédit par les logiciels usuels. Le site de reconnaissance par la thrombine est composé de 6 résidus, dont les résidus en position P2 et P1 (la nomenclature du site de reconnaissance est la suivante : **P4/P3/P2/P1/P'1/P'2**) sont obligatoirement une proline et une arginine, respectivement ; la thrombine clive après le résidu en position P1, l'arginine, mais il existe une certaine flexibilité quant à l'identité des autres résidus (**P4** : A, F, G, I, L, T, V ou M ; **P3** : A, F, G, I, L, T, V ou W ; **P1'** et **P2'** : tout sauf D ou E). Or, l'extrémité N-terminale de Drs2p contient, entre les résidus 180 et 185, une séquence, GEPRVI, qui est proche de satisfaire aux critères d'un site de coupure par la thrombine : cette séquence n'est différente de la séquence clivée par la thrombine que pour le résidu en position **P3** (E au lieu de A, F, G, I, L, T, V ou W). Une coupure inattendue dans cette zone serait compatible avec la taille apparente de la version tronquée de Drs2p apparue dans les expériences avec la thrombine. En outre, l'extrémité N-terminale de Drs2p est prédite pour être peu structurée et donc potentiellement facilement accessible à la thrombine (Annexe 1). Nous avons donc décidé de changer le site de clivage : un site de clivage par la protéase TEV a été choisi, à cause de la plus grande spécificité de cette protéase (Dougherty et al., 1988).

La purification par affinité sur résine streptavidine nous a permis d'obtenir un complexe Drs2p/Cdc50p qui est toujours capable de former un dérivé phosphorylé, avec un rendement de purification de l'ordre de 7% (Tableau 1) et une activité ATPasique spécifique de ~0,5 µmol d'ATP/mg de Drs2p/min en présence de PI(4)P et de PS. L'activité spécifique de Drs2p est clairement stimulée par le PI(4)P. La sensibilité de cette activité ATPasique à la présence de C₁₂E₈ pourrait être compatible avec l'idée que ce détergent tend à inactiver le complexe Drs2p/Cdc50p. Contrairement au fluorure de béryllium, le vanadate n'inhibe pas l'activité ATPasique stimulée par le PI(4)P du complexe Drs2p/Cdc50p, mais l'activité ATPasique de Serca1a n'est pas non plus inhibée par le vanadate en présence d'une concentration millimolaire d'ATP.

La stratégie de purification en une seule étape mise au point semble prometteuse puisqu'elle nous permet d'obtenir 0,5 mg de complexe Drs2p/Cdc50p actif pour 1 litre de culture. En termes de rendement de purification, les résultats obtenus pour la purification du complexe Drs2p/Cdc50p

(Tableau 1) sont comparables à ceux naguère obtenus pour Serca1a-Bad (Jidenko et al., 2006). Ceci est encourageant pour démarrer les essais de cristallisation, puisque ces rendements ont suffi pour obtenir la structure de Serca1a-Bad en 2005, en collaboration avec le département de Biologie Moléculaire de l'Université d'Aarhus au Danemark.

Tableau 1. Bilan de la purification du complexe Drs2p-Bad/Cdc50p pour 1 litre de culture.

Fraction	Drs2p-Bad (mg/L de culture)	Vitesse maximale d'hydrolyse d'ATP ($\mu\text{mol d'ATP/mg de Drs2p/min}$)	Rendement (%)
C3	10	ND	100
Eluat après la streptavidine	0,5	0,52	7

ND : non déterminé. 1 litre de culture en Fernbach aboutit à la récolte de ~35g de levures et le fractionnement de ces levures aboutit à ~300 mg de protéines totales dans les membranes C3. Drs2p-Bad représente 3% des protéines totales dans la fraction membranaire C3, soit 10 mg.

A l'occasion de notre purification du complexe inactif, Drs2p^{D560N}/Cdc50p, nous avons retrouvé, comme dans le cas du complexe sauvage, que seule la forme glycosylée de Cdc50p était solubilisable. Pour ce mutant, cependant, Cdc50p glycosylée n'est solubilisable qu'en partie, tout comme Drs2p^{D560N}, ce qui indique que la glycosylation de Cdc50p ne garantit pas sa solubilisation.

Afin de vérifier que Drs2p et Cdc50p étaient toujours en complexe après l'étape de purification sur résine streptavidine et de progresser vers l'obtention d'un échantillon de qualité suffisante pour espérer démarrer des essais de cristallisation, nous avons soumis l'éluat issu de la purification sur résine streptavidine à une filtration sur gel, et constaté qu'en présence de PS, le complexe Drs2p/Cdc50p restait associé (Fig. 7).

Précédemment, la purification de Drs2p n'a été tentée que dans deux études (Lenoir et al., 2009; Zhou and Graham, 2009). La mesure de l'activité ATPasique de Drs2p après purification, quant à elle, n'a été décrite qu'une fois (Zhou and Graham, 2009), avec un résultat (0,45 $\mu\text{mol de Pi/mg de Drs2p/min}$) comparable à ce que nous avons mesuré. Une comparaison précise entre cette étude et nos propres résultats est cependant difficile, parce que l'activité ATPasique de Drs2p purifiée rapportée par Zhou et collègues augmentait de 40 % en présence de PS et que nous n'avons pas pu tester la dépendance en PS de la nôtre à cause de la présence de PS pendant notre purification, et parce que nous avons observé une stimulation par le PI(4)P mais que l'effet du PI(4)P n'a pas été testé par cette équipe.

ATP8A2, une ATPase de type P4 de la membrane des photorécepteurs de la rétine, a elle aussi été très récemment purifiée, et son activité ATPasique mesurée (54 $\mu\text{mol de Pi/mg d'ATP8A2/min}$, (Coleman et al., 2009) est très élevée comparée à celle que nous avons obtenue pour Drs2p. Cette différence est peut-être due à une régulation différente d'ATP8A2, du fait d'un besoin physiologique différent. En effet, il se peut, comme cela a été déjà suggéré dans le Chapitre III.1, qu'ATP8A2 ait

besoin d'être très active pour contrebalancer l'activité de transport bidirectionnel de lipides indépendante de l'ATP catalysée par l'opsine contenue dans les membranes de la rétine d'où ATP8A2 est extraite (Menon et al., 2011).

Indépendamment de (ou en relation avec) cette différence possible entre les activités ATPasiques de ATP8A2 et Drs2p, il faut cependant noter que notre mesure d'une activité ATPasique significative et sensible au PI(4)P après purification du complexe Drs2p/Cdc50p, si elle est encourageante, pose un problème de compatibilité avec nos mesures de déphosphorylation lente avant purification. Quelques hypothèses susceptibles d'expliquer la contradiction apparente entre nos mesures de déphosphorylation et nos mesures d'activité ATPasique seront évoquées dans la conclusion de ce travail.

III.3 Caractérisation préliminaire du rôle des extrémités N- et C-terminale de Drs2p

III.3.1 Introduction : phosphorylation et déphosphorylation d'une version tronquée de Drs2p

Pour la caractérisation fonctionnelle du complexe Drs2p/Cdc50p en membranes (Chapitre III.1), au-delà de la mesure par filtration du dérivé phosphorylé formé, nous avons eu recours à une autre méthode de détection de ce dérivé phosphorylé, permettant de discriminer entre la phosphorylation de la protéine entière et la phosphorylation de ses éventuelles formes tronquées. Cette méthode repose sur la séparation électrophorétique, sur des gels acides (dits gels « Sarkadi »), des polypeptides phosphorylés par l'ATP radioactif, suivie par une autoradiographie du gel (sur « PhosphorImager »). En effet, la liaison acyl-phosphate formée entre l'aspartate phosphorylé et le phosphate est stable en milieu acide ; cette technique permet donc d'attribuer une quantité de radioactivité à une protéine donnée, contrairement à la technique de filtration qui ne discrimine pas entre les contributions des diverses protéines à la quantité de radioactivité totale mesurée. Nous pensions initialement utiliser cette technique de façon ponctuelle pour associer sans ambiguïté à Drs2p les phosphorylations mesurées par simple filtration, mais cette technique a également révélé la phosphorylation d'une forme tronquée de Drs2p. Un résultat typique de cette méthode de détection du dérivé phosphorylé est présenté sur la Figure 1.

Pour contrôle, la formation de dérivé phosphorylé a d'abord été analysée, en présence ou en absence de calcium, avec des membranes de réticulum sarcoplasmique contenant Serca1a dont le comportement est bien maîtrisé au laboratoire. Sur la Figure 1A, on peut voir qu'en présence de calcium (puits « RS » (Ca = en calcium)) une bande intense migre à la position attendue pour Serca1a (110 kDa). Les autres bandes, de poids moléculaire supérieur à 110 kDa, pourraient représenter des formes agrégées de Serca1a. En absence de calcium, cation essentiel pour la phosphorylation de Serca1a (Hasselbach, 1978), la formation de dérivé phosphorylé est totalement inhibée (puits « RS » (EG= en présence d'EGTA)), comme on s'y attend.

Les membranes C3 contenant le complexe Drs2p/Cdc50p ont été ensuite analysées par la même méthode, en absence et en présence de vanadate (VO_4). On peut remarquer que, en absence de vanadate, deux bandes d'intensités voisines, au lieu d'une seule, sont révélées par l'autoradiographie dans la région de la masse moléculaire attendue pour Drs2p-Bad (Fig. 1A). Ces deux bandes sont spécifiques de Drs2p puisqu'elles ne sont pas visibles lorsqu'on tente de phosphoryler des membranes C3 contenant le complexe inactif Drs2p^{D560N}/Cdc50p (Fig. 1A). Comme déjà vu par filtration (Fig. 17, Chapitre III.1), le vanadate inhibe l'apparition de ces bandes. De plus, l'analyse des membranes C3 ne contenant que Drs2p (Fig. 1A) confirme (Fig. 12, Chapitre III.1) la nécessité de la co-expression avec Cdc50p pour la phosphorylation de Drs2p. La quantité de Drs2p-Bad est équivalente pour les différents échantillons, comme on le voit sur les western-blot révélés avec une sonde avidine.

De ces deux bandes, l'une migre à la position attendue pour Drs2p-Bad (154 kDa + 9 kDa) tandis que l'autre migre un peu en-dessous de 150 kDa, dans la zone où migre également la version tronquée de Drs2p dont il a été question dans le Chapitre III.2 et qui avait été révélée avec un anticorps dirigé contre Drs2p. L'analyse de ces mêmes échantillons par un western-blot avec la sonde avidine (Fig. 1B) ne montre cependant, comme précédemment, qu'une seule bande, à la position

attendue pour Drs2p-Bad, suggérant donc de nouveau que le deuxième polypeptide phosphorylé correspondrait à une troncature C-terminale de Drs2p. On ne peut cependant pas exclure qu'il y ait, en plus, un clivage protéolytique dans l'extrémité N-terminale de Drs2p puisque nous n'avons pas d'anticorps dirigé contre l'extrémité N-terminale.

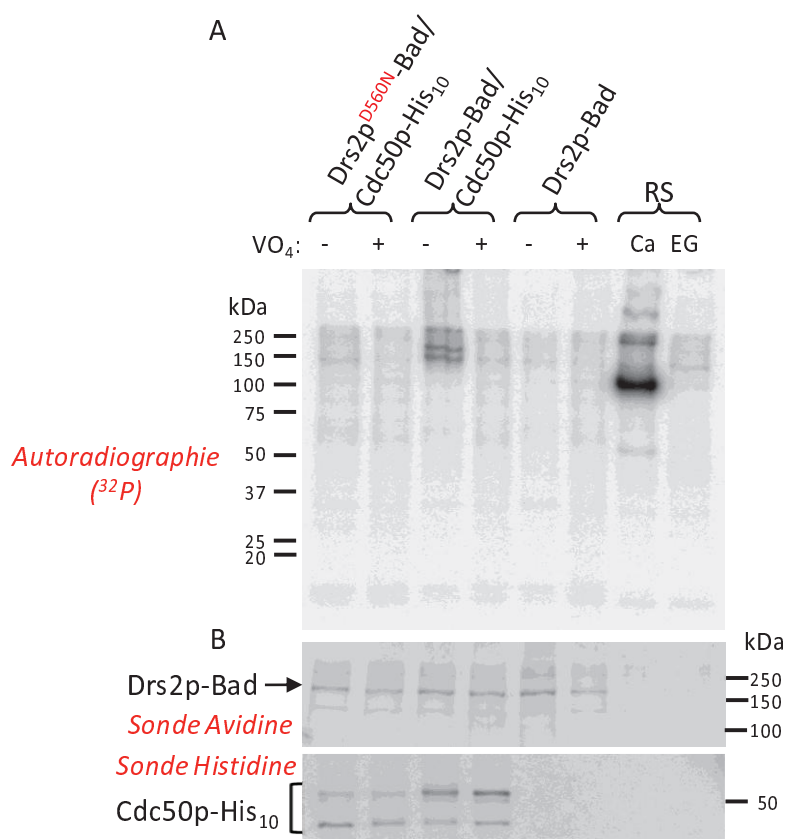


Figure 1. Analyse par SDS-PAGE en conditions acides (« Sarkadi ») de la phosphorylation par le [γ-³²P] ATP.

Les membranes C3, diluées à 0,5 mg/mL de protéines totales dans le tampon A (50 mM Mops-Tris à pH 7, 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 100 μM CaCl₂), ont été phosphorylées par le [γ-³²P] ATP en absence ou en présence de 1 mM de vanadate (VO₄), dans la glace. Après 30 secondes de phosphorylation, les échantillons ont été précipités par de l'acide (500 mM TCA + 30 mM H₃PO₄) puis centrifugés à 13000 rpm pendant 20 minutes (Jouan A14). Ils ont ensuite été lavés par 50 mM de TCA et 3 mM de H₃PO₄ puis le culot a été repris par 60 μL de tampon de dépôt (150 mM Tris-HCl pH 6,8 ; 10 mM EDTA ; 2% (p/v) SDS ; 8 M urée ; 0,02% (p/v) Bleu de Bromophénol ; 5% (v/v) β-Mercaptoethanol) et 10 μL ont été déposés sur un gel acide (de type « Sarkadi »). Les membranes C3 contiennent soit Drs2p muté sur son site catalytique (Drs2p^{D560N}) et co-exprimé avec Cdc50p, soit Drs2p sauvage co-exprimé avec Cdc50p, soit Drs2p sur-exprimé en la seule présence de Cdc50p endogène ; les deux derniers puits correspondent à des membranes de levures contrôles supplémentées avec 10 μg.mL⁻¹ de Réticulum Sarcoplasmique (RS). Dans ce dernier cas, et pour le dernier puits, 2 mM d'EGTA (EG) a été ajouté, au lieu du vanadate, pour empêcher la phosphorylation de Serca1a dans les membranes de RS. Le gel acide, dont le contenu en ³²P est mesuré par autoradiographie avec un PhosphorImager, est présenté en **A**. **B**. Analyse par western-blot du contenu des différents échantillons déposés sur le gel acide. La détection de Drs2p-Bad a été effectuée à l'aide d'une sonde avidine alors que la détection de Cdc50p-His₁₀ a été faite à l'aide d'une sonde histidine. Dépôt : 0,1 μL de chaque fraction a été déposé pour l'analyse par western-blot.

Comme précédemment, la présence d'une version tronquée de Drs2p contenue dans les membranes C3 a pu, dans ces expériences, être confirmée par l'utilisation d'un anticorps dirigé contre Drs2p (Fig. 2). Les deux polypeptides détectés sont spécifiques de Drs2p sur-exprimée puisqu'on ne les observe pas dans le cas des membranes obtenues après la transformation des levures par un vecteur vide (Fig. 2), et le fait que dans ces conditions l'on ne détecte même pas la protéine Drs2p endogène indique que les protéines Drs2p sur-exprimées sont présentes en très grande quantité par rapport aux protéines endogènes. Par contre, dans le cas du mutant, on peut voir que ce fragment tronqué n'apparaît pas, ce qui laisse supposer ou bien que Drs2p mutée est dans une conformation qui n'a pas été reconnue par la ou les protéase(s) de la levure, ou bien que Drs2p mutée n'a pas atteint le compartiment où a lieu la troncature (Fig. 2).

Grâce aux marqueurs de poids moléculaire, nous avons estimé que la différence entre les deux polypeptides phosphorylés était d'environ 20 kDa. Le domaine Bad ayant un poids moléculaire de 9 kDa, la coupure protéolytique aurait donc lieu ~11 kDa avant l'extrémité C-terminale de Drs2p, soit ~100 résidus en amont de l'extrémité C-terminale de Drs2p (aux alentours du résidu 1255), du moins dans le cas où il n'y aurait qu'une coupure du côté C-terminal de Drs2p.

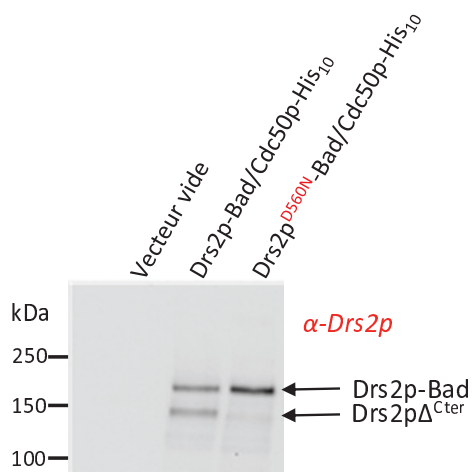


Figure 2. Analyse des membranes C3 par l'anticorps dirigé contre Drs2p.

Les membranes C3 analysées contiennent soit Drs2p muté sur son site catalytique (*Drs2p^{D560N}*) et co-exprimé avec Cdc50p, soit Drs2p co-exprimé avec Cdc50p. Pour contrôle, des membranes préparées à partir d'une culture de levures transformées par un vecteur vide ont été incluses. 0,4 µg de protéines totales a été déposé sur SDS-PAGE. Ici, la détection de Drs2p a été effectuée à l'aide d'un anticorps dirigé contre Drs2p.

Sachant maintenant que Drs2p était présente dans les membranes C3 sous deux formes différentes mais toutes deux capables de se phosphoryler, nous nous sommes demandés quelle était leur contribution respective à la cinétique de déphosphorylation observée par filtration (Fig. 21-22, Chapitre III.1). Dans cette optique, et puisque l'un de nos précédents résultats remarquables dans le Chapitre III.1 (Fig. 21) était qu'en absence de PI(4)P, la PS ralentissait la cinétique de déphosphorylation du complexe Drs2p/Cdc50p, tandis qu'en présence de PI(4)P, la PS accélérerait cette cinétique, nous avons suivi en présence ou en absence de PI(4)P, et en présence de PS, la cinétique de déphosphorylation des différentes versions de Drs2p dans les complexes Drs2p/Cdc50p. La Figure 3A montre que la version complète de Drs2p-Bad (Fig. 3A, « Drs2p-Bad ») a une cinétique

de déphosphorylation très lente en présence de PS seule et que l'addition de PI(4)P accélère significativement sa déphosphorylation, entre 20 et 150 secondes ; cette dépendance au PI(4)P est bien cohérente avec celle observée précédemment par filtration (Fig. 21, Chapitre III.1). En revanche, la version tronquée de Drs2p (« Drs2pΔCter ») semble se déphosphoryler relativement rapidement déjà en absence de PI(4)P (Fig. 3A, « Drs2pΔCter »), et elle est donc beaucoup moins sensible au PI(4)P. Dans cette expérience comme dans la précédente, la détection des protéines biotinylées par la sonde avidine ou de Cdc50p-His₁₀ par la sonde histidine (Fig. 3B) suggère que les quantités de Drs2p-Bad et de Cdc50p-His₁₀ sont comparables dans les différents échantillons. La troncature en C-terminal de Drs2p semble donc induire une accélération de la déphosphorylation déjà en absence de PI(4)P.

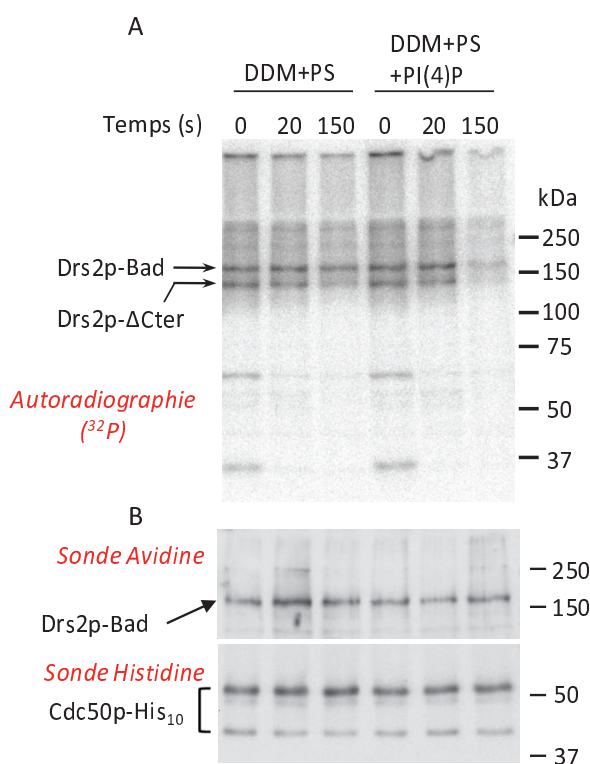


Figure 3. Analyse par autoradiographie de la cinétique de déphosphorylation des différents complexes Drs2p/Cdc50p présents dans les membranes C3.

Les membranes C3 contenant le complexe Drs2p-Bad/Cdc50p-His₁₀, et diluées dans le tampon A (50 mM Mops-Tris à pH 7, 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂) supplémenté avec 100 μM de Ca²⁺ et 1 mM d'EGTA, ont été solubilisées à 0,5 mg protéines/ml dans 2 mélanges différents de détergent/lipides : d'un côté DDM+PS (0,5 mg/ml DDM (1 g/g de protéines totales) + 0,025 mg/ml POPS), et de l'autre DDM+PS+PI(4)P (0,5 mg/ml DDM + 0,025 mg/ml POPS + 0,025 mg/ml PI(4)P). La déphosphorylation a été réalisée selon le protocole dit « sans dilution » (voir « Matériel et méthodes », Chapitre II.5.a) et le protocole pour la mesure du dérivé phosphorylé par autoradiographie d'un gel de type Sarkadi (A) est présenté dans le « Matériel et méthodes » (Chapitre II.5.b). B. Analyse par western-blot des différents échantillons déposés sur le gel pour l'autoradiographie. La détection de Drs2p-Bad a été effectuée à l'aide d'une sonde avidine, alors que la détection de Cdc50p-His₁₀ a été faite à l'aide d'une sonde histidine. Dépôt : 0,2 μL des échantillons a été déposé sur les gels pour l'analyse par western-blot.

En outre, des travaux antérieurs montrent, sur l'extrémité C-terminale de Drs2p, la présence d'une zone enrichie en résidus positifs (résidus 1268 à 1273), susceptible d'interagir avec le PI(4)P (Natarajan et al., 2009). Dans cette étude, il a aussi été montré que la présence de PI(4)P stimule la translocation de phospholipides par Drs2p dans les membranes du *trans*-Golgi. Ces mêmes auteurs ont identifié les résidus 1268 à 1289 de Drs2p comme constituant un domaine homologue à une partie du domaine PH (« Pleckstrin Homology ») de la protéine Vps36p (l'une des protéines contenant ce type de domaine). Au sein de cette séquence, le patch de résidus basiques mentionné ci-dessus (résidus 1268 à 1273) est suivi d'une hélice α (résidus 1274 à 1283) qui est conservée au sein des ATPases de type P4 homologues de Drs2p (ATPases P4 de classe 1a, comme Drs2p, et 1b, (Paulusma and Elferink, 2010) ; Annexe 2). Ce domaine possède 3 acides aminés communs avec un domaine dans Drs2p (résidus 1250 à 1270) d'interaction avec un échangeur de nucléotides des protéines Arf (Arf-GEF), Gea2p (Chantalat et al., 2004), et il a été montré que l'interaction avec Gea2p entraînait aussi une activation de Drs2p (Natarajan et al., 2009).

Puisque l'extrémité C-terminale de Drs2p semble inhiber la fonction de Drs2p et que cette inhibition serait levée par la présence du PI(4)P, nous avons donc émis l'hypothèse que l'extrémité C-terminale de Drs2p pourrait posséder un domaine d'auto-inhibition dont l'activité inhibitrice serait régulée par la présence de PI(4)P. L'implication potentielle de l'extrémité N-terminale a également été prise en considération. Afin de tester ces possibilités, nous avons créé différentes versions tronquées de Drs2p, dans l'espoir de pouvoir ainsi identifier un éventuel rôle régulateur des extrémités terminales de Drs2p et caractériser le mécanisme de cette régulation.

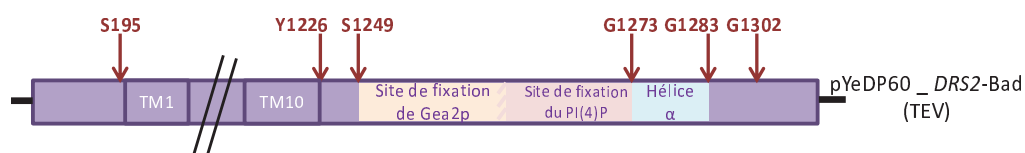
III.3.2 Clonage des différentes versions tronquées de Drs2p dans le vecteur pYeDP60

La position des différentes troncatures de *DRS2* choisies est présentée sur la Figure 4A. Le choix a été guidé par différents objectifs : déterminer l'importance du domaine homologue au domaine PH de Vps36p, déterminer l'importance de l'extrémité C-terminale et notamment de sa région de fixation potentielle du PI(4)P, et déterminer l'importance de l'extrémité N-terminale. Nous pensions aussi, à ce moment là, que la coupure par la protéase de la levure avait lieu uniquement dans l'extrémité C-terminale, aux alentours du résidu 1255. Nous avons donc réalisé plusieurs constructions avec troncature avant ou après ce résidu, pour nous permettre de déterminer l'importance relative de l'hélice α (Fig. 4B, Drs2p¹⁻¹²⁸³ et Drs2p¹⁻¹²⁷³) ou du site de fixation du PI(4)P et de Gea2p (Fig. 4B, Drs2p¹⁻¹²⁴⁹), voire de la totalité de l'extrémité C-terminale (Fig. 4B, Drs2p¹⁻¹²²⁶). Comme un alignement de séquences réalisé pour Drs2p et d'autres ATPases de type P4 (Annexe 2) montre aussi qu'en aval de son site de fixation potentielle du PI(4)P, Drs2p possède 50 acides aminés de plus qu'ATP8A2, dont l'activité spécifique très forte ne semble pas nécessiter la présence de PI(4)P (Coleman et al., 2009), nous avons aussi cherché à déterminer l'importance des 50 derniers résidus de Drs2p dans l'auto-inhibition potentielle de Drs2p, et tenté de construire le peptide tronqué Drs2p¹⁻¹³⁰² (Fig 4B). En ce qui concerne l'extrémité N-terminale, une seule troncature a été testée, celle consistant à enlever la totalité de l'extrémité N-terminale (Fig. 4B, Drs2p¹⁹⁵⁻¹³⁵⁵).

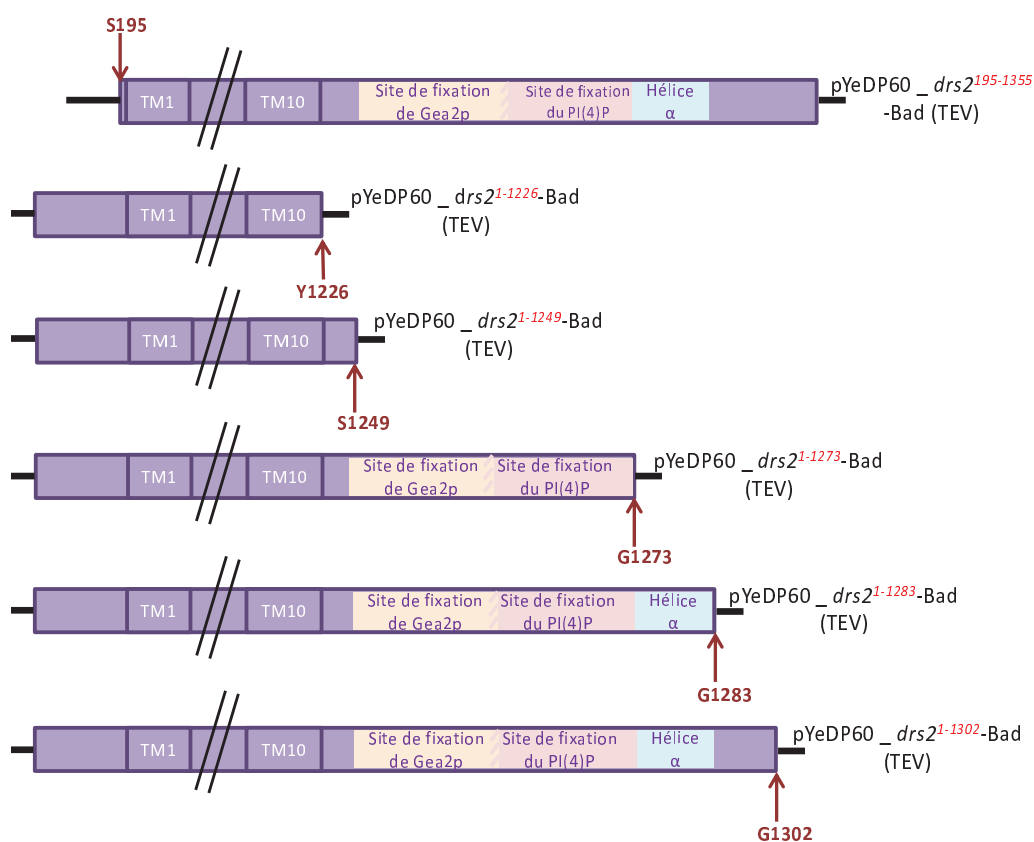
Pour cela, nous avons tout d'abord cloné les différentes versions tronquées de Drs2p dans le vecteur pYeDP60. La Figure 4C représente les vecteurs de simple expression obtenus pour les

différentes troncatures de *DRS2* et possédant la séquence codant le site de coupure par la protéase TEV.

A



B



C

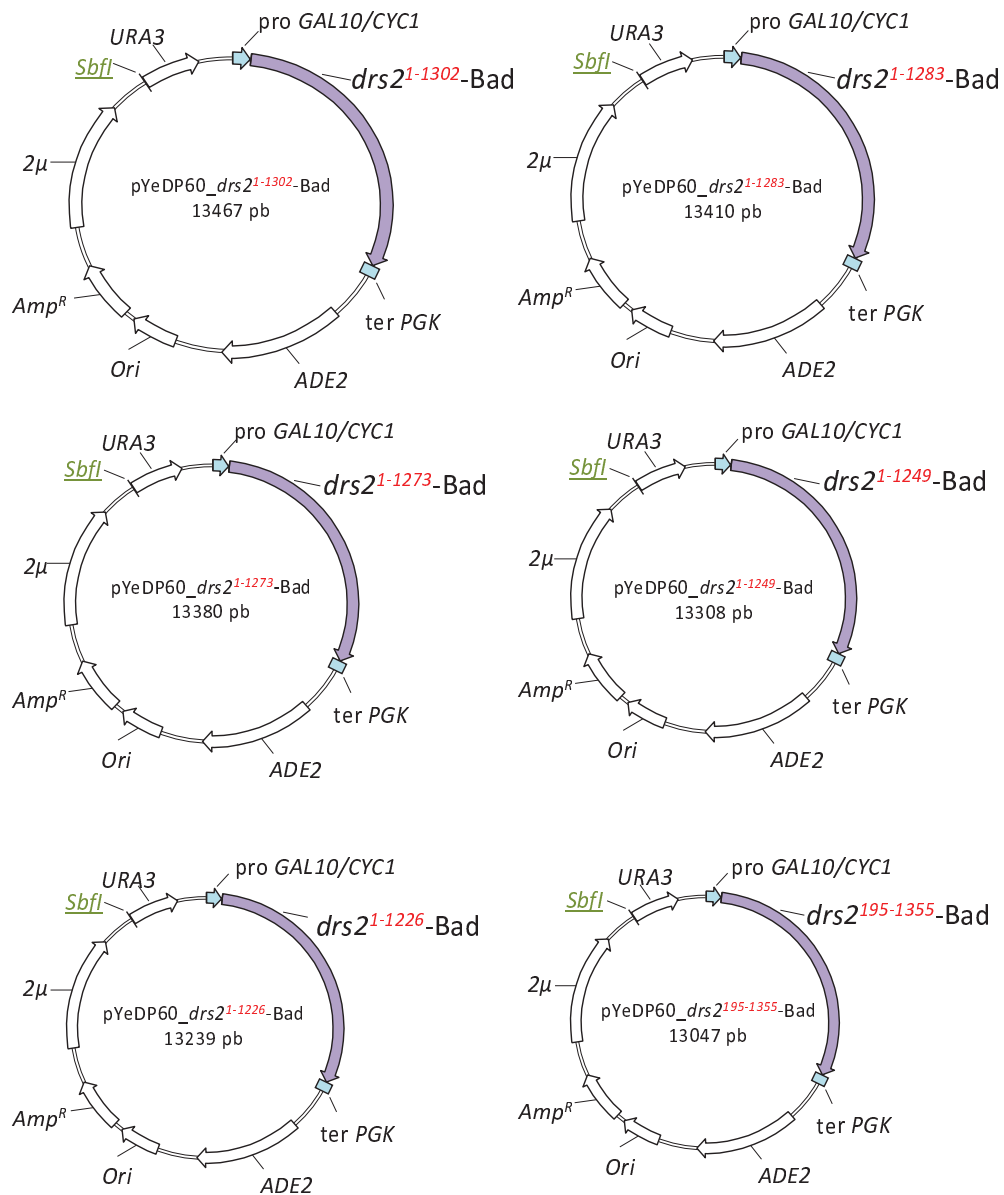


Figure 4. Schéma des différentes troncatures créées pour l'étude du rôle des extrémités N- et C-terminales dans l'activité de Drs2p.

Le plasmide pYeDP60_*DRS2*-Bad (A) a été utilisé pour engendrer les différentes troncatures du gène *DRS2* (B). En rouge sont signalés la position de la troncature et le dernier et le premier acide aminé de la version tronquée de Drs2p (S : sérine ; Y : tyrosine ; G : glycine). TM : segment transmembranaire. Les vecteurs de simple expression contenant les différentes troncatures de *DRS2* sont représentés en C. Les plasmides pYeDP60 contiennent les gènes *DRS2* tronqués et étiquetés avec un domaine accepteur de biotine (Bad) du côté 3'. Ils sont sous le contrôle d'un promoteur hybride fort GAL10/CYC1, inductible par le galactose. La séquence terminatrice est celle de la phosphoglycérate kinase (ter PGK). ADE2: marqueur de sélection pour l'adénine, Ori: origine de réplication bactérienne, Amp^R: gène de résistance à l'ampicilline, 2μ: origine de réplication de levure, URA3: marqueur de sélection pour l'uracile; SbfI indique la position du site de coupe (unique) pour cette enzyme de restriction.

III.3.3 Analyse de la fonctionnalité des protéines tronquées et de leur expression en milieu minimum

De la même manière que nous avons évalué l'influence des différentes étiquettes, à différentes positions, sur la capacité à s'exprimer et la fonctionnalité de *DRS2* dans le Chapitre III.1., nous avons testé la capacité à s'exprimer et la fonctionnalité des différentes versions tronquées de *DRS2* (clonées dans le vecteur de simple expression). Pour cela, un test de croissance des levures à basse température (voir « Matériel et Méthodes », Chapitre II.3.j) et une préparation de fractions membranaires après croissance en milieu minimum (voir « Matériel et Méthodes », Chapitre II.4.c) ont été réalisés.

Comme le montre la Figure 5, la souche sauvage *DRS2* transformée par le vecteur vide (témoin positif) pousse parfaitement à 28°C et à 20°C alors que la souche $\Delta drs2$ transformée par le vecteur vide (témoin négatif) montre le phénotype de sensibilité aux basses températures. La souche $\Delta drs2$ transformée par les différentes versions tronquées de *DRS2* a ensuite été testée : les différentes troncatures de *DRS2* ont toutes restauré la capacité de croissance des levures $\Delta drs2$ à basse température. Ceci suggère que les différentes versions tronquées de Drs2p sont, au moins en partie, fonctionnelles et exprimées.

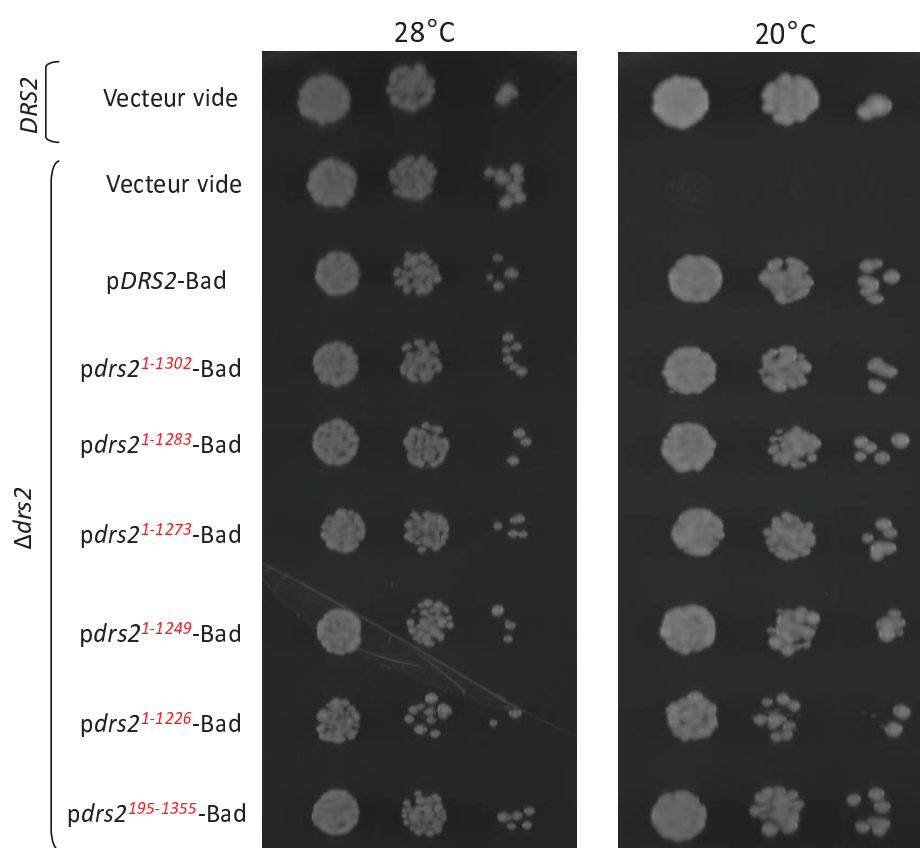


Figure 5. Test de restauration de la croissance des levures à basse température.

La souche de levure délétée pour *DRS2* ($\Delta drs2$) a été transformée par les vecteurs de simple expression portant soit *DRS2* sauvage soit une version tronquée de *DRS2*, et également par le vecteur vide. Pour contrôle, la souche sauvage (*DRS2*) a été elle aussi transformée par le vecteur vide. Plusieurs dilutions de cultures de levures ont été déposées sur un milieu contenant 2% de galactose et 2% de fructose pour une croissance à 28°C (à gauche) ou à la température restrictive de 20°C (à droite), pendant 3-5 jours.

L'expression des protéines Drs2p sauvage ou tronquées, en milieu minimum, a ensuite été étudiée par western-blot (Fig. 6). Drs2p et ses différents mutants ont bien été détectés par la sonde avidine, ainsi que, évidemment, les protéines naturellement biotinylées de la levure. Sur la Figure 6A, on peut voir que la protéine Drs2p sauvage et biotinylée est exprimée de façon équivalente dans la souche sauvage (WT) et dans la souche $\Delta drs2$. La protéine tronquée Drs2p¹⁻¹³⁰²-Bad s'exprime en quantité similaire à la protéine sauvage, mais migre un peu plus rapidement, comme attendu (Fig. 6A), tandis que les autres protéines tronquées à l'extrémité C-terminale, Drs2p¹⁻¹²²⁶-Bad, Drs2p¹⁻¹²⁴⁹-Bad, Drs2p¹⁻¹²⁸³-Bad et Drs2p¹⁻¹²⁷³-Bad sont plus faiblement exprimées (Fig. 6A et 6B). En revanche, l'expression de la protéine tronquée à l'extrémité N-terminale, Drs2p¹⁹⁵⁻¹³⁵⁵-Bad (Fig. 6B), est comparable voire supérieure à celle de la protéine sauvage.

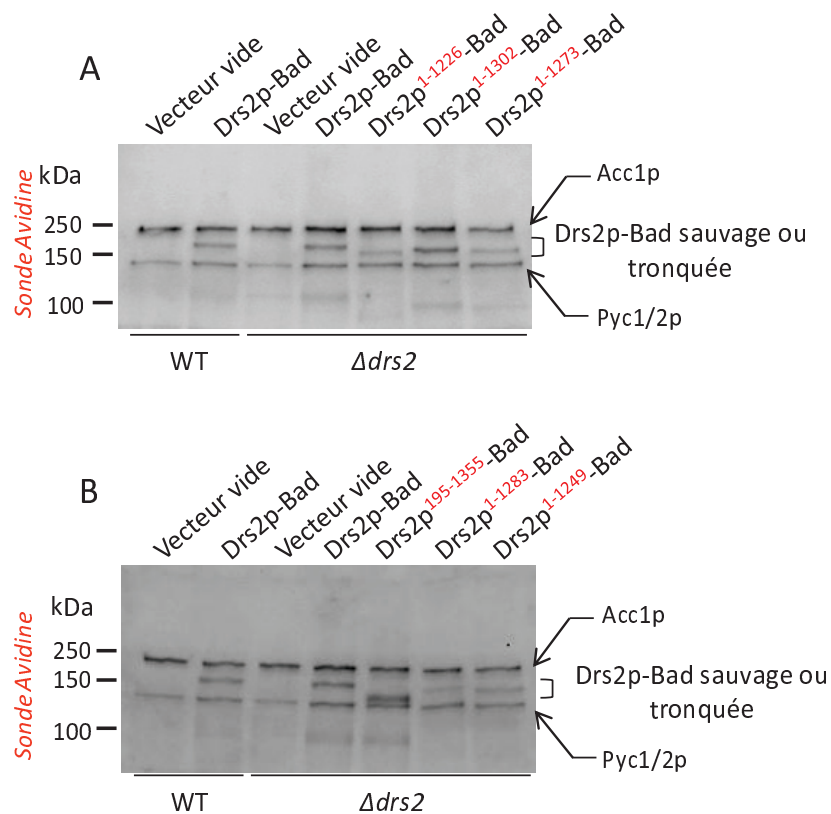


Figure 6. Analyse de l'expression de Drs2p, sauvage ou tronquée, en milieu minimum.

Des levures transformées soit par le vecteur vide (témoin négatif), soit par le vecteur contenant le gène *DRS2* sauvage (témoin positif), soit par le vecteur de simple expression comportant l'un des gènes *DRS2* tronqués, ont été broyées afin de préparer des membranes totales après expression en milieu minimum. Les membranes obtenues ont été resuspendues et déposées sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes. Pour la détection, une sonde avidine a été utilisée. Acc1p :acétyl-CoA carboxylase ; Pyc1/2p :pyruvate carboxylase.

III.3.4. Co-expression en milieu riche des protéines tronquées et de Cdc50p-His₁₀

Maintenant que nous avons vérifié que les différentes versions tronquées de Drs2p, sur le vecteur de simple expression, s'exprimaient et étaient fonctionnelles du point de vue de la restauration de la croissance à froid, et sachant l'importance de Cdc50p pour l'adressage et la fonction de la protéine Drs2p sauvage, nous avons construit les vecteurs de co-expression contenant les versions tronquées de Drs2p (et la protéine Cdc50p sauvage). L'expression et la capacité à former un dérivé phosphorylé de ces différentes constructions ont été étudiées après croissance des levures en milieu riche et fractionnement membranaire, comme précédemment (« Matériel et Méthodes », Chapitre II.4.d).

Le contenu en protéines (Drs2p-Bad, sauvage ou tronquée, et Cdc50p-His₁₀) des fractions membranaires C3 obtenues pour chaque construction a été analysé par western-blot. La détection des protéines biotinylées par la sonde avidine (Fig. 7A), indique que les protéines Drs2p-Bad tronquées sont toutes exprimées et biotinylées, mais en quantité moindre que la protéine Drs2p-Bad sauvage (ceci est d'autant plus vrai pour les mutants Drs2p¹⁻¹²⁷³-Bad et Drs2p¹⁻¹²⁸³-Bad). Cela confirme les résultats obtenus après expression en milieu minimum (Fig. 6). Par contre, dans le cas d'une détection de Drs2p-Bad par l'anticorps α -Drs2p (Fig. 7B), l'expression des protéines tronquées semble comparable à celle de la protéine sauvage (voire même plus importante pour Drs2p¹⁻¹²²⁶-Bad). Comme la sonde avidine détecte les protéines biotinylées alors que l'anticorps α -Drs2p détecte la totalité des protéines Drs2p exprimées, biotinylées ou non, cela suggère que les protéines tronquées sont proportionnellement moins biotinylées que la protéine sauvage. Ce défaut de biotinylation des protéines tronquées pourrait refléter un défaut de repliement de Drs2p dans les membranes de levure (le domaine accepteur de biotine doit être replié correctement pour être biotinylé).

Avec cette détection par l'anticorps spécifiquement dirigé contre Drs2p (Fig. 7B), on retrouve pour Drs2p-Bad sauvage la présence (dont il a déjà été question au Chapitre III.2) de 2 polypeptides migrant avec des vitesses voisines de celle du marqueur de 150 kDa, correspondant probablement à Drs2p-Bad entier et à un produit tronqué, précédemment nommé Drs2p Δ Cter.

Pour les mutants, un deuxième polypeptide n'apparaît cependant pas toujours. Pour le mutant Drs2p¹⁻¹²⁸³ (troncature juste après l'hélice α), on observe encore ce deuxième polypeptide, apparemment au même poids moléculaire que la version tronquée précédente ; ceci indique que ce mutant-là est toujours reconnu par la ou les protéase(s) de la levure responsable(s) de cette troncature. En revanche, les mutants plus courts tronqués en C-terminal, et déjà le mutant Drs2p¹⁻¹²⁷³ (troncature juste avant l'hélice α), ne semblent plus être reconnus par cette protéase. On peut donc imaginer que l'hélice α C-terminale conservée au sein des ATPases P4 homologues à Drs2p a peut-être un rôle dans la structuration de l'extrémité C-terminale nécessaire à la reconnaissance de Drs2p par la protéase de levure. Il aurait été intéressant de voir si les membranes C3 contenant le fragment tronqué le plus long, Drs2p¹⁻¹³⁰², présentaient elles aussi, cette version tronquée ; malheureusement le vecteur de co-expression correspondant n'a pas encore été obtenu. Par ailleurs, la protéine tronquée Drs2p¹⁹⁵⁻¹³⁵⁵, déletée en N-terminal mais avec un C-terminal intact, n'est pas non plus clivée par la protéase de la levure. L'extrémité N-terminale de Drs2p pourrait donc elle aussi être importante pour la reconnaissance de la partie C-terminale de Drs2p par la protéase de la levure, en

participant peut-être à la formation de la structure reconnue par la protéase. Une autre hypothèse serait que les mutants n'auraient pas atteint le compartiment où a lieu la protéolyse.

Enfin, nous avons analysé avec la sonde histidine, qui permet l'analyse de l'expression de Cdc50p-His₁₀ (Fig. 7C), le contenu des fractions membranaires C3 obtenues à partir de levures transformées par les diverses constructions. Pour les différentes versions tronquées de Drs2p, le niveau d'expression de Cdc50p est raisonnablement corrélé à celui de Drs2p (Fig. 7, C *versus* B), mais le profil de glycosylation pour Cdc50p-His₁₀ est en général en faveur de la forme *non* glycosylée lors de sa *co*-expression avec Drs2p tronquée (Fig. 7C), et devient encore plus favorable à cette forme non glycosylée pour la *co*-expression avec la protéine tronquée la plus courte, Drs2p¹⁻¹²²⁶. Au vu de cette modification du profil de glycosylation pour les mutants C-terminaux, et sachant que les protéines Drs2p et Cdc50p sont dépendantes l'une de l'autre pour leur adressage correct dans les membranes du *trans*-Golgi ((Chen et al., 2006; Furuta et al., 2007; Saito et al., 2004), il est tentant de penser que la troncature C-terminale de Drs2p diminue l'interaction avec Cdc50p. D'ailleurs, une interaction réduite entre le mutant D560N de Drs2p et la protéine Cdc50p a déjà été montrée (Lenoir et al., 2009), et la proportion de la protéine Cdc50p glycosylée, dans ce cas là, est aussi réduite (Fig. 7C).

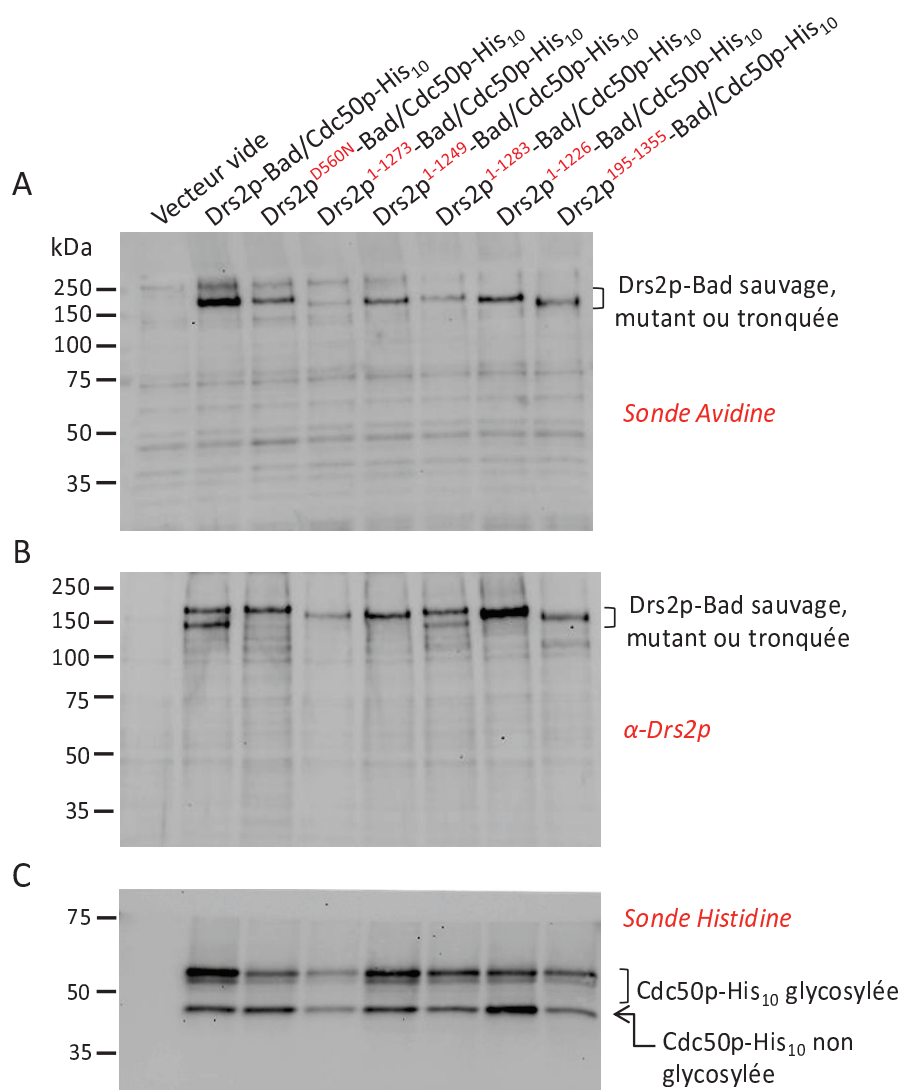


Figure 7. Analyse de l'expression de Drs2p, sauvage ou tronquée, dans les membranes C3, après croissance en milieu riche.

Les membranes C3 ont été obtenues à partir de levures (souche sauvage) transformées soit par un vecteur vide, soit par les vecteurs de co-expression comportant à la fois le gène *CDC50* et le gène *DRS2*, sauvage (témoin positif) ou muté au niveau de l'aspartate catalytique (témoin négatif: Drs2p^{D560N}), ou encore portant l'une des troncatures. 1,5 µg de protéines totales a été déposé sur SDS-PAGE pour la détection avec la sonde avidine ou avec la sonde histidine, et 1 µg de protéines totales a été déposé sur SDS-PAGE pour la détection avec l'anticorps α-Drs2p.

Nous avons ensuite mesuré la capacité de phosphorylation de ces mutants tronqués. Dans le cas où l'auto-inhibition hypothétique de Drs2p serait levée par ces troncatures, nous nous attendons à une augmentation de la vitesse de déphosphorylation (donc une augmentation du turn-over catalytique) et possiblement à une diminution du dérivé phosphorylé formé à l'état stationnaire par rapport à celui obtenu pour Drs2p sauvage.

Comme déjà montré au Chapitre III.1.3, les membranes co-exprimant Drs2p sauvage et Cdc50p présentent un dérivé phosphorylé sensible au vanadate (~2,5 pmol de dérivé phosphorylé/0,1 mg de

protéines totales) et ce signal est spécifique de Drs2p puisque la mutation sur l'aspartate catalytique de Drs2p (D560N) abolit presque complètement sa présence (Fig. 8). Par contre, pour les protéines tronquées, la formation de dérivé phosphorylé sensible au vanadate ne dépasse qu'à peine le niveau du bruit de fond.

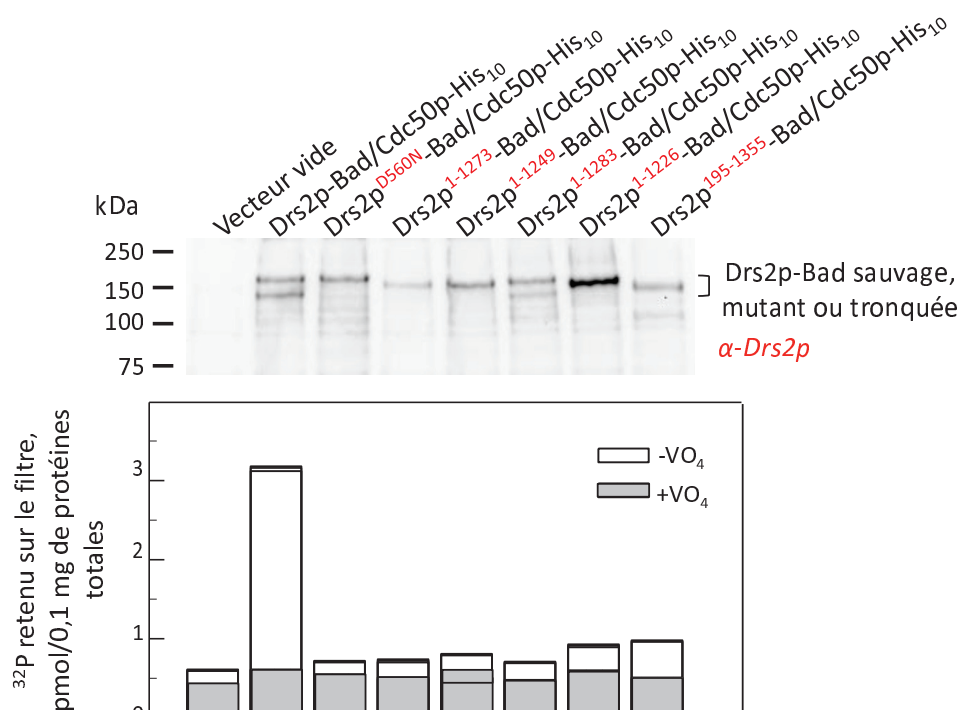


Figure 8: Mesures de dérivé phosphorylé pour différentes constructions, notamment les constructions de Drs2p tronquée.

Les membranes C3 contenant à la fois les différentes versions de Drs2p et la protéine Cdc50p, ainsi que les membranes ne contenant aucune de ces deux protéines (vecteur vide) ont été utilisées pour la mesure des dérivés phosphorylés. 200 μ L de chaque échantillon ont été incubés dans de la glace, à une concentration de 0,5 mg/mL de protéine dans du tampon A (50 mM Mops-Tris à pH 7, 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 100 μ M CaCl₂ et 1 mM d'EGTA) et cela en présence ou en absence de vanadate (VO₄, 1 mM). De l'ATP radioactif à 0,5 μ M a été ajouté à chaque échantillon et incubé en présence des membranes pendant 25 secondes. La réaction a été arrêtée par précipitation acide des protéines. Les membranes précipitées ont ensuite été filtrées et la radioactivité a été comptée par scintillation.

Il n'est cependant pas encore possible, à ce stade, d'interpréter de façon non ambiguë cet effet, puisque nous ne savons pas si la diminution de la formation du dérivé phosphorylé à l'état stationnaire est due à une augmentation de la vitesse de déphosphorylation qui entraînerait la diminution de la quantité de dérivé phosphorylé formé à l'état stationnaire, comme initialement imaginé, ou bien plutôt à une impossibilité de former ce dérivé phosphorylé (voir « Discussion »).

III.3.4 Discussion

L'objectif de ce chapitre était de tenter de caractériser le rôle des extrémités N- et C-terminales dans la régulation du transport de lipides. Pour ce faire, nous avons créé des mutants de Drs2p tronqués du côté N-terminal ou du côté C-terminal. Les différents mutants tronqués de Drs2p restaurent tous la croissance des levures $\Delta drs2$ à basse température, suggérant qu'ils sont au moins en partie fonctionnels.

Ces résultats sont cependant à confirmer, puisque dans deux études récentes (Chantalat et al., 2004; Natarajan et al., 2009), des mutants de l'extrémité C-terminale de Drs2p ne restaurent *pas* la croissance à basse température. Dans ces deux études, lorsque l'on délète partiellement ou totalement la région de fixation du PI(4)P de Drs2p (constituée de la zone enrichie en résidus positifs RMKKQR, résidus 1268 à 1273, et de l'hélice α , résidus 1273 à 1283), on diminue la capacité de ces constructions à restaurer la croissance à basse température des levures $\Delta drs2$, et cette diminution est beaucoup plus forte lorsque l'on a délété en particulier la zone enrichie en résidus positifs. Et des troncatures au-delà de cette région (en aval du résidu 1284) ou, et de manière plus intéressante, une délétion dans la zone du site de fixation de Gea2p en amont du site de fixation du PI(4)P, n'entraînent qu'une très faible altération voire aucune altération de cette capacité de restauration. Ces résultats sont compatibles avec nos propres résultats pour les constructions $drs2^{1-1273}$ -Bad et $drs2^{1-1302}$ -Bad, mais pas pour les constructions $drs2^{1-1226}$ -Bad, $drs2^{1-1249}$ -Bad et $drs2^{1-1273}$ -Bad. Peut-être cette différence est-elle due aux différentes souches de levures utilisées dans les deux laboratoires pour tester cette restauration. Pour la troncature N-terminale, il n'existe pas, à ce jour, de données à comparer à nos résultats.

Notre étude a, par ailleurs, montré que le niveau d'expression des protéines tronquées biotinylées était en général plus faible que le niveau d'expression de Drs2p sauvage biotinylée, ce qui pourrait indiquer que l'extrémité C-terminale de Drs2p a un rôle dans la stabilité de la protéine. Les délétions de Drs2p affectent aussi le niveau de glycosylation de Cdc50p, ce qui suggère que l'interaction entre Drs2p et Cdc50p est altérée. Si tel est le cas, l'adressage du complexe vers le *trans*-Golgi pourrait être perturbé.

L'étude de la phosphorylation des différents mutants de Drs2p, co-exprimés avec leur partenaire Cdc50p, a aussi montré que la quantité de dérivé phosphorylé formée était faible. Compte-tenu des résultats précédents, concernant le test de restauration de la croissance des levures $\Delta drs2$ à basse température, la quantité de protéines Drs2p-Bad biotinylées et la proportion de protéines Cdc50p-His₁₀ glycosylées, deux interprétations pourraient expliquer l'absence de formation du dérivé phosphorylé pour les différentes protéines tronquées :

- (a) les troncatures augmentent la vitesse de déphosphorylation de Drs2p, comme initialement espéré.
- (b) les troncatures inhibent la formation du dérivé phosphorylé sur Drs2p, soit directement à cause de la troncature, soit indirectement ; ou bien parce que la troncature aboutit à un mauvais repliement de Drs2p, ou bien parce que la troncature empêche la formation correcte du complexe Drs2p/Cdc50p, lui-même critique pour l'obtention finale d'un complexe actif.

L'interprétation (b), avec une responsabilité indirecte de la troncature, serait compatible avec la faible biotinylation des protéines tronquées (Fig. 7), qui nous a fait supposer que les mutants tronqués exprimés s'étaient en partie mal repliés. Les protéines tronquées fonctionnelles ne seraient qu'en trop petite quantité pour permettre de détecter la formation du dérivé phosphorylé (mais en quantité suffisante pour restaurer la croissance à froid). De même, nous avons vu que les délétions de Drs2p affectaient le niveau de glycosylation de Cdc50p (Fig. 6C), ce qui nous a fait supposer que l'interaction entre Drs2p et Cdc50p pouvait être altérée dans la levure, et comme nous avons déjà montré l'importance de la co-expression avec Cdc50p pour la phosphorylation de Drs2p (Chapitre III.1, Fig. 12), une altération de la formation du complexe Drs2p/Cdc50p pourrait donc aussi expliquer la perte de phosphorylation.

Dans le cadre de l'interprétation (b), pour discriminer entre une inhibition directe ou indirecte de la phosphorylation, il faudrait trouver un moyen de tronquer l'extrémité C-terminale après formation d'un complexe correctement replié de Drs2p avec un Cdc50p qui aurait auparavant joué correctement son rôle de chaperon. Ce qui pourrait être proposé, c'est d'insérer la séquence du site de clivage par la TEV à des positions variables du gène *DRS2* (celles choisies dans cette étude pour déterminer l'extrémité C-terminale des différents mutants) afin de procéder aux troncatures après co-expression du complexe, et alors étudier leur éventuel effet sur la fonction.

L'interprétation (a) serait compatible avec notre hypothèse de départ sur la présence de domaines d'auto-inhibition sur les extrémités N- ou/et C-terminales de Drs2p. En effet, la vitesse de déphosphorylation des mutants, qui ne subissent plus d'auto-inhibition, serait alors suffisamment élevée pour que la quantité de dérivé phosphorylé présent à l'état stationnaire soit fortement diminuée.

Pour discriminer entre les interprétations (a) et (b), il faudrait mesurer l'activité ATPasique des mutants tronqués (une vitesse de déphosphorylation accrue devrait augmenter la vitesse globale de l'hydrolyse de l'ATP), voire leur capacité à transporter des lipides en système reconstitué. Mais pour pouvoir mesurer ces activités ATPasiques, une purification de chacune des protéines tronquées sera inévitable, pour éliminer les contaminants tels que l'ATPase à proton de la membrane plasmique de levure, Pma1p (déjà montrée sur la Figure 10 du Chapitre III.1). Ce n'est qu'après purification des différentes protéines Drs2p tronquées, en complexe avec la protéine Cdc50p, que nous pourrions conclure quant à la fonctionnalité des mutants de Drs2p tronqués en N- ou C-terminal que nous avons préparés.

Il serait aussi intéressant d'étudier l'extrémité N-terminale plus en détail, en réalisant différentes troncatures comme cela a été fait pour l'extrémité C-terminale. À propos de cette extrémité N-terminale, il faut d'ailleurs remarquer que nous ne pouvons pas exclure complètement la possibilité que le fragment tronqué de Drs2p précédemment nommé « Drs2p Δ Cter » soit en fait coupé en C-terminal ET en N-terminal. Pour clarifier les choses, on peut envisager d'effectuer un séquençage N-terminal de cette forme tronquée, et pour déterminer sa masse exacte (et donc son extrémité C-terminale), nous pourrions avoir recours à la spectrométrie de masse.

Il serait d'autant plus intéressant d'étudier plus en détail le rôle de cette extrémité N-terminale que nous venons de réaliser (mais trop tard) qu'une différence majeure entre notre Drs2p et la protéine ATP8A2 : l'extrémité N-terminale de Drs2p est beaucoup plus courte que celle de ATP8A2, d'environ 160 acides aminés (cf Annexe 2).

S'il est finalement confirmé que la délétion des extrémités N- et/ou C-terminale de Drs2p, en un endroit spécifique, lève une auto-inhibition de la protéine entière qui pré-existerait, cela pourrait avoir des retombées intéressantes pour la compréhension des modes de régulation de Drs2p. Il resterait cependant évidemment à savoir si cette forme tronquée est également compétente du point de vue du transport de lipides. Beaucoup de choses restent donc à faire !

IV. Conclusions et perspectives

Co-expression de Drs2p et Cdc50p

La mise au point de la co-expression de Drs2p et Cdc50p nous a permis d'obtenir une fraction membranaire enrichie en membranes dérivées du Golgi, qui contient environ 3% de Drs2p, formant au moins en partie un complexe avec Cdc50p. La qualité de ces membranes nous a permis de débiter l'étude du cycle catalytique de Drs2p sans devoir passer par une purification préalable. Nous avons mis en évidence la formation d'un dérivé phosphorylé sur le résidu D560 de Drs2p, dépendant de la présence de Cdc50p (et à hauteur, environ, de 0,15 mol ^{32}P /mol de Drs2p, en membranes ou en présence de DDM. Les résultats obtenus indiquent que les glycosylations des protéines CDC50 sont probablement importantes dans les étapes initiales de la formation du complexe des protéines CDC50 avec les ATPases de type P4 (adressage du complexe, maturation), mais qu'elles ne sont pas essentielles pour la phosphorylation de l'ATPase P4 une fois le complexe formé. Nos résultats ont aussi suggéré que la fixation sur la forme « E1 » de Drs2p d'un ion qui serait transporté par Drs2p, n'est pas nécessaire pour le démarrage du cycle catalytique par l'ATPase. Par ailleurs, les inhibiteurs connus des ATPases de type P, tels le vanadate et les composés fluorés, inhibent la phosphorylation catalytique de Drs2p. Finalement, la capacité de Drs2p à se déphosphoryler suggère que le complexe Drs2p/Cdc50p est capable de réaliser un cycle catalytique complet.

Afin de mettre au point des conditions de solubilisation du complexe Drs2p/Cdc50p, pour une purification ultérieure ou encore pour déterminer l'effet de différents types de lipides sur Drs2p, plusieurs détergents ont été testés. Il est ressorti de ces essais que le DDM semblait le meilleur choix pour solubiliser le complexe Drs2p/Cdc50p glycosylé, tout en protégeant sa capacité à former à l'état stationnaire une proportion raisonnable d'enzyme phosphorylée et en minimisant l'inactivation irréversible du complexe. En outre, le DDM ne semble pas perturber de façon significative la cinétique de déphosphorylation de Drs2p.

L'effet de différents lipides sur la cinétique de déphosphorylation de Drs2p a ensuite été testé. Nous avons observé que contre toute attente, la PS, substrat de Drs2p qui devrait normalement accélérer la déphosphorylation de Drs2p, ralentit cette vitesse de déphosphorylation. En revanche, en présence de PI(4)P, on observe bien l'effet stimulateur attendu de la PS. Une des conclusions principales des travaux présentés dans cette thèse est donc que seule la fixation de PI(4)P permet la déphosphorylation rapide de la protéine en présence de PS, alors qu'en absence de PI(4)P, la PS ajoutée peut probablement accéder à son site de fixation, mais sans pouvoir être transportée : en la seule présence de PS, la protéine serait bloquée dans sa conformation « E2P ». Le PI(4)P est un régulateur important du trafic membranaire. L'effet du PI(4)P sur la « flippase » Drs2p que nous avons identifié est donc parfaitement cohérent avec l'implication de Drs2p dans le trafic membranaire.

Pour aller plus loin dans la dissection du mécanisme de transport, du rôle du PI(4)P, et pour débiter les études structurales, nous devons nécessairement purifier le complexe Drs2p/Cdc50p.

Purification du complexe Drs2p/Cdc50p et propriétés fonctionnelles

Le protocole de purification que nous avons mis au point au laboratoire pour la purification du complexe Drs2p/Cdc50p est prometteur, puisqu'il nous permet d'obtenir 0,5 mg de complexe actif à partir de 1 litre de culture en Fernbach, après une seule étape de chromatographie d'affinité, sur résine streptavidine. Ce rendement devrait encore augmenter lorsque nous mettrons en route des cultures en fermenteur. Après la purification sur la résine streptavidine, l'analyse par filtration sur gel montre que Drs2p et Cdc50p sont toujours majoritairement en complexe.

L'obtention d'un complexe purifié et actif permet d'envisager des essais de reconstitution en protéoliposomes du complexe Drs2p/Cdc50p, afin d'étudier le transport de lipides de manière classique (*i.e.* en utilisant des lipides fluorescents ; voir aussi ci-dessous). Nous devrions également pouvoir préciser le rôle du PI(4)P et étudier les détails du cycle catalytique du complexe Drs2p/Cdc50p, et encore identifier, à l'aide de la mutagenèse dirigée, les résidus importants pour la fonction, le transport, ou encore pour l'interaction de Drs2p avec Cdc50p. Les effets de mutations déjà identifiées dans diverses pathologies pourront aussi être étudiés, après mutation des résidus correspondant dans Drs2p. Enfin, les essais de cristallisation du complexe Drs2p/Cdc50p pourront être démarrés, en vue de son étude structurale par cristallographie aux rayons X.

Il nous reste cependant, pour que cette purification soit significative, à résoudre le problème de l'apparent désaccord entre nos mesures de la cinétique de déphosphorylation de Drs2p (lente) et nos mesures de son activité ATPasique (relativement rapide). D'un côté, nous mesurons après purification une activité ATPasique sensible à la présence de PI(4)P et relativement rapide (voisine de $\sim 0,5 \mu\text{mol de Pi/mg de Drs2p/min}$ (en présence de PS et de PI(4)P), ce qui n'est d'ailleurs pas très différent de ce qui a été déjà mesuré pour Drs2p par Zhou et collègues en 2009). De l'autre, nous mesurons des cinétiques de déphosphorylation qui, même en présence de PS et de PI(4)P, ont des temps caractéristiques de l'ordre de la minute, beaucoup trop lents pour engendrer la libération de phosphate mesurée.

Cette apparente contradiction suggère la présence de deux populations d'ATPases Drs2p dans nos échantillons. Une de ces populations aurait une vitesse de turnover catalytique relativement élevée, reflétée par nos mesures d'activité ATPasique, suffisamment élevée pour que son dérivé phosphorylé formé à l'état stationnaire ne contribue que pour peu aux résultats des mesures de phosphorylation et de déphosphorylation ; l'autre aurait un turnover catalytique lent, reflété par nos cinétiques de déphosphorylation, tellement lent qu'elle ne contribuerait en rien à l'activité ATPasique mesurée. Le seul point commun de ces deux formes de Drs2p serait qu'elles sont toutes deux modulées par le PI(4)P. Plusieurs hypothèses peuvent alors être émises quant à l'identité de ces deux populations.

La première serait qu'une des populations serait constituée du complexe Drs2p/Cdc50p sauvage et l'autre population d'une protéine Drs2p tronquée à son extrémité N-terminale, qui serait toujours sensible au PI(4)P, toujours en complexe avec Cdc50p et qui hydrolyserait plus vite l'ATP que la version sauvage. Pour tester cette hypothèse, on pourrait identifier par séquençage d'Edman cette éventuelle troncature, déjà soupçonnée (western-blots des Figures 4 et 5 du Chapitre III.2).

L'obtention du mutant tronqué correspondant pourrait permettre de confirmer le fait que cette version tronquée hydrolyse plus vite l'ATP que la version non tronquée.

La deuxième hypothèse serait la coexistence, dans la fraction purifiée, de protéines Drs2p isolées et de protéines Drs2p en complexe avec Cdc50p, avec un turn-over beaucoup plus lent pour le complexe que pour Drs2p seul. Pour tester cette hypothèse, on pourrait créer un nouveau vecteur de co-expression, codant d'une part, DRS2/le site de clivage par la TEV/l'étiquette Bad comme précédemment, et d'autre part une nouvelle version de CDC50, qui ne contiendrait pas le site de clivage par la TEV précédemment introduit. Le complexe exprimé et purifié sur résine streptavidine serait alors mis en présence de résine Ni^{2+} -NTA, qui retiendrait le complexe Drs2p/Cdc50p par l'intermédiaire de Cdc50p, et la fraction de Drs2p non retenue (non associée à Cdc50p) pourrait alors être étudiée du point de vue de son activité ATPasique propre ou de ses propriétés de phosphorylation et déphosphorylation.

La troisième hypothèse serait que la présence à l'extrémité C-terminale de Drs2p de l'étiquette Bad dans les membranes, ou de la persistance de la TEV dans l'éluat purifié, pourrait inhiber significativement la déphosphorylation de Drs2p, et que notre tentative d'éliminer cette possibilité (Fig. 22E du Chapitre III.1) n'ait pas été suffisamment probante : si Bad a bel et bien été décroché par l'action de la TEV dans cette expérience, il n'est pas impossible que la TEV elle-même soit restée fixée à son site de coupure, site qui parce qu'il était greffé en C-terminal de Drs2p n'a perdu qu'un seul acide aminé à la suite de cette coupure. L'élimination de la protéase TEV de l'éluat de la streptavidine, par l'ajout d'un peptide substrat et fixation sur une résine Ni^{2+} -NTA (TEV possède une étiquette de 6 histidines en position C-terminale), permettrait de vérifier cette dernière hypothèse. Une autre possibilité serait de réaliser de nouvelles constructions avec le site de coupure par la protéase TEV et l'étiquette Bad sur l'extrémité N-terminale de Drs2p.

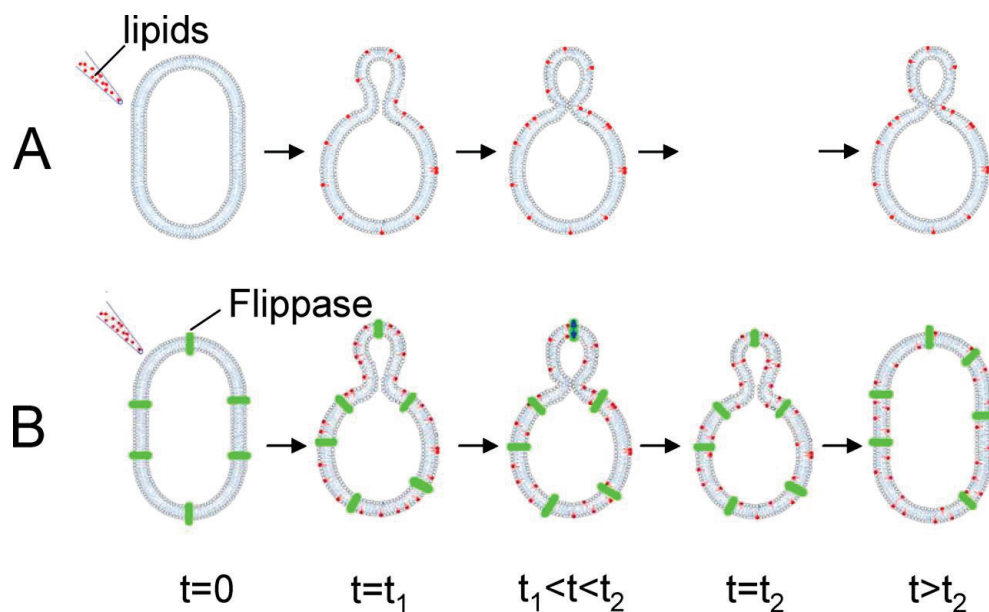
Une quatrième possibilité, enfin, pourrait être que l'apparente hétérogénéité de nos préparations soit en rapport avec la lente dérive que nous avons observée au cours de leur incubation dans leur milieu de phosphorylation avant addition de l'ATP radioactif, nos membranes C3 se phosphorylant d'autant mieux qu'elles ont été pré-incubées à froid pendant un temps long avant la phosphorylation (une heure ou plus, voir par exemple Chapitre III.1, Fig. 18D, symboles blancs). Si par exemple une phosphorylation non catalytique de Drs2p par une kinase, sur l'un ou l'autre des résidus sérine de Drs2p, affecte le turnover de Drs2p, et si la dérive observée reflète l'action d'une phosphatase endogène attaquant lentement cette sérine phosphorylée, on aurait là une source possible d'hétérogénéité. La solution pourrait être alors de sélectionner la forme phosphorylée ou la forme déphosphorylée.

Rôle physiologique des ATPases P4

Pour un organisme multicellulaire, la séquestration de la PS sur le feuillet cytoplasmique des cellules présente un intérêt majeur pour divers processus de reconnaissance (par exemple, l'exposition de la PS à l'extérieur des cellules en apoptose devenant, pour les macrophages, un signal de reconnaissance). Mais cette seule implication ne suffit pas pour comprendre l'intérêt, pour un organisme unicellulaire comme la levure, de transporter la PS : ce transport de PS doit donc avoir une

autre fonction indépendante de la communication avec l'extérieur. Au vu des données de la littérature, il est tentant de penser que l'implication des ATPases P4 dans le trafic membranaire est la fonction principale que ces ATPases ont en commun ; il apparaît donc crucial d'identifier le lien entre l'activité de ces ATPases et le trafic membranaire. Ce lien pourrait bien être le fait que la formation de vésicules requiert une déformation membranaire préalable, et que celle-ci pourrait être la conséquence directe du transport de lipides.

Afin de tenter de prouver ce lien entre l'activité de flippase de Drs2p et les déformations membranaires, il serait intéressant de reconstituer le complexe Drs2p/Cdc50p purifié en vésicules géantes (GUV), et de tester, par microscopie optique, si l'activité de flippase de Drs2p est corrélée à des déformations membranaires. On sait déjà que l'ajout d'environ 1% de lipides sur feuillet externe d'une vésicule géante entraîne la formation de bourgeons à la surface de la vésicule (Lopez-Montero et al., 2005; Papadopoulos et al., 2007), et que la présence d'une flippase active (mais non purifiée) dans ces membranes entraîne la disparition de ce bourgeon (Fig. 1, (Papadopoulos et al., 2007)). Il serait intéressant de tenter de créer ces bourgeons à l'aide de Drs2p purifiée (et de ses partenaires lipidiques et protéiques adéquats).



Papadopoulos A et al. J. Biol. Chem. 2007;282:15559-15568

Figure 1. Mise en évidence du transport de phospholipides naturels par une flippase, via la relaxation des déformations de membranes préalablement induites par l'addition de lipides à une vésicule géante (GUV).

L'insertion de phospholipides exogènes à $t = 0$ sur le feuillet externe de la vésicule entraîne la formation d'un bourgeon. En absence de relaxation rapide, le bourgeon reste stable (A), alors qu'en présence d'un transport de lipides médié par une flippase non purifiée du RE (B) (ou d'un flip-flop rapide et spontané), le bourgeon disparaît et la vésicule retrouve sa forme originelle.

En fait, le transport de lipides par les ATPases P4 n'a pas encore été prouvé de façon absolument non ambiguë, puisque les tests de transport ont été réalisés soit sur cellules entières (par exemple

des levures), ce qui ne permet pas d'exclure un transport secondaire, soit avec des protéines purifiées mais en utilisant des lipides modifiés par un groupement fluorescent. Or, une étude a montré qu'ABCB1 (une ATPase qui n'appartient pas à la famille des ATPases de type P, mais à la famille des protéines ABC) transportait le NBD-glucosylcéramide mais pas le glucosylcéramide naturel (Halter et al., 2007). Il apparaît donc primordial d'établir un test de transport de lipides naturels, et de bien identifier le lipide naturel transporté de façon préférentielle.

Observer des déformations membranaires des GUV par microscopie optique lors de l'activité de transport de lipides par le complexe Drs2p/Cdc50p purifié nous permettrait justement de répondre à cette question, en nous affranchissant de l'utilisation de lipides modifiés par un groupement fluorescent. Une collaboration avec l'équipe de Joost Holthuis, à Utrecht, a été entamée pour mettre au point la formation de vésicules géantes contenant le complexe Drs2p/Cdc50p et démarrer ces essais.

À plus long terme, la compréhension de la fonction de Drs2p et des autres ATPases P4 nous permettra de comprendre le lien entre dysfonctionnement des ATPases P4 humaines et les pathologies associées à ce dysfonctionnement.

V. Bibliographie

- Abe, F. (2007) Exploration of the effects of high hydrostatic pressure on microbial growth, physiology and survival: perspectives from piezophysiology. *Biosci Biotechnol Biochem*, **71**, 2347-2357.
- Alder-Baerens, N., Lisman, Q., Luong, L., Pomorski, T. and Holthuis, J.C. (2006) Loss of P4 ATPases Drs2p and Dnf3p disrupts aminophospholipid transport and asymmetry in yeast post-Golgi secretory vesicles. *Mol Biol Cell*, **17**, 1632-1642.
- Axelsen, K.B. and Palmgren, M.G. (1998) Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. *J Mol Evol*, **46**, 84-101.
- Bal, N., Mintz, E., Guillain, F. and Catty, P. (2001) A possible regulatory role for the metal-binding domain of CadA, the *Listeria monocytogenes* Cd²⁺-ATPase. *FEBS Lett*, **506**, 249-252.
- Bretscher, M.S. (1972) Asymmetrical lipid bilayer structure for biological membranes. *Nat New Biol*, **236**, 11-12.
- Bretscher, M.S. (1973) Membrane structure: some general principles. *Science*, **181**, 622-629.
- Bryde, S., Hennrich, H., Verhulst, P.M., Devaux, P.F., Lenoir, G. and Holthuis, J.C. (2010) CDC50 proteins are critical components of the human class-1 P4-ATPase transport machinery. *J Biol Chem*, **285**, 40562-40572.
- Bublitz M., Poulsen H., Morth J.P., Nissen P. (2010) In and out of the cation pumps: P-type ATPase structure revisited. *Curr Opin Struct Biol*, **20**, 431-439.
- Bull, L.N., van Eijk, M.J., Pawlikowska, L., DeYoung, J.A., Juijn, J.A., Liao, M., Klomp, L.W., Lomri, N., Berger, R., Scharschmidt, B.F., Knisely, A.S., Houwen, R.H. and Freimer, N.B. (1998) A gene encoding a P-type ATPase mutated in two forms of hereditary cholestasis. *Nat Genet*, **18**, 219-224.
- Cacciagli, P., Haddad, M.R., Mignon-Ravix, C., El-Waly, B., Moncla, A., Missirian, C., Chabrol, B. and Villard, L. (2010) Disruption of the ATP8A2 gene in a patient with a t(10;13) de novo balanced translocation and a severe neurological phenotype. *Eur J Hum Genet*, **18**, 1360-1363.
- Cardi, D., Montigny, C., Arnou, B., Jidenko, M., Marchal, E., le Maire, M. and Jaxel, C. (2010) Heterologous expression and affinity purification of eukaryotic membrane proteins in view of functional and structural studies: The example of the sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase. *Methods Mol Biol*, **601**, 247-267.
- Catty, P., de Kerchove d'Exaerde, A. and Goffeau, A. (1997) The complete inventory of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* P-type transport ATPases. *FEBS Lett*, **409**, 325-332.
- Chantalat, S., Park, S.K., Hua, Z., Liu, K., Gobin, R., Peyroche, A., Rambourg, A., Graham, T.R. and Jackson, C.L. (2004) The Arf activator Gea2p and the P-type ATPase Drs2p interact at the Golgi in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci*, **117**, 711-722.
- Chapman-Smith, A. and Cronan, J.E., Jr. (1999) The enzymatic biotinylation of proteins: a post-translational modification of exceptional specificity. *Trends Biochem Sci*, **24**, 359-363.
- Chen, B., Jiang, Y., Zeng, S., Yan, J., Li, X., Zhang, Y., Zou, W. and Wang, X. (2010) Endocytic sorting and recycling require membrane phosphatidylserine asymmetry maintained by TAT-1/CHAT-1. *PLoS Genet*, **6**, e1001235.
- Chen, C.Y., Ingram, M.F., Rosal, P.H. and Graham, T.R. (1999) Role for Drs2p, a P-type ATPase and potential aminophospholipid translocase, in yeast late Golgi function. *J Cell Biol*, **147**, 1223-1236.
- Chen, S., Wang, J., Muthusamy, B.P., Liu, K., Zare, S., Andersen, R.J. and Graham, T.R. (2006) Roles for the Drs2p-Cdc50p complex in protein transport and phosphatidylserine asymmetry of the yeast plasma membrane. *Traffic*, **7**, 1503-1517.
- Clausen, J.D., Vilsen, B., McIntosh, D.B., Einholm, A.P. and Andersen, J.P. (2004) Glutamate-183 in the conserved TGES motif of domain A of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase assists in catalysis of E2/E2P partial reactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 2776-2781.

- Cohen, E., Goldshleger, R., Shainskaya, A., Tal, D.M., Ebel, C., le Maire, M. and Karlsh, S.J. (2005) Purification of Na⁺,K⁺-ATPase expressed in *Pichia pastoris* reveals an essential role of phospholipid-protein interactions. *J Biol Chem*, **280**, 16610-16618.
- Coleman, J.A., Kwok, M.C. and Molday, R.S. (2009) Localization, purification, and functional reconstitution of the P4-ATPase Atp8a2, a phosphatidylserine flippase in photoreceptor disc membranes. *J Biol Chem*, **284**, 32670-32679.
- Coleman, J.A. and Molday, R.S. (2011) Critical role of the beta-subunit CDC50A in the stable expression, assembly, subcellular localization, and lipid transport activity of the P4-ATPase ATP8A2. *J Biol Chem*, **286**, 17205-17216.
- Coleman, J.A., Vestergaard, A.L., Molday, R.S., Vilsen, B. and Peter Andersen, J. (2012) Critical role of a transmembrane lysine in aminophospholipid transport by mammalian photoreceptor P4-ATPase ATP8A2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **109**, 1449-1454.
- D'Angelo, G., Vicinanza, M., Di Campli, A. and De Matteis, M.A. (2008) The multiple roles of PtdIns(4)P -- not just the precursor of PtdIns(4,5)P₂. *J Cell Sci*, **121**, 1955-1963.
- Daiho, T., Kubota, T. and Kanazawa, T. (1993) Stoichiometry of tight binding of magnesium and fluoride to phosphorylation and high-affinity binding of ATP, vanadate, and calcium in the sarcoplasmic reticulum Ca(2⁺)-ATPase. *Biochemistry*, **32**, 10021-10026.
- Darland-Ransom, M., Wang, X., Sun, C.L., Mapes, J., Gengyo-Ando, K., Mitani, S. and Xue, D. (2008) Role of *C. elegans* TAT-1 protein in maintaining plasma membrane phosphatidylserine asymmetry. *Science*, **320**, 528-531.
- de Saint-Jean, M., Delfosse, V., Douguet, D., Chicanne, G., Payraastre, B., Bourguet, W., Antonny, B. and Drin, G. (2011) Osh4p exchanges sterols for phosphatidylinositol 4-phosphate between lipid bilayers. *J Cell Biol*, **195**, 965-978.
- Devaux, P.F., Herrmann, A., Ohlwein, N. and Kozlov, M.M. (2008) How lipid flippases can modulate membrane structure. *Biochim Biophys Acta*, **1778**, 1591-1600.
- Dhar, M., Webb, L.S., Smith, L., Hauser, L., Johnson, D. and West, D.B. (2000) A novel ATPase on mouse chromosome 7 is a candidate gene for increased body fat. *Physiol Genomics*, **4**, 93-100.
- Dhar, M.S., Somvardahl, C.S., Kirkland, T., Nelson, S., Donnell, R., Johnson, D.K. and Castellani, L.W. (2004) Mice heterozygous for Atp10c, a putative amphipath, represent a novel model of obesity and type 2 diabetes. *J Nutr*, **134**, 799-805.
- Dhar, M.S., Yuan, J.S., Elliott, S.B. and Somvardahl, C. (2006) A type IV P-type ATPase affects insulin-mediated glucose uptake in adipose tissue and skeletal muscle in mice. *J Nutr Biochem*, **17**, 811-820.
- Donaldson, J.G. and Jackson, C.L. (2000) Regulators and effectors of the ARF GTPases. *Curr Opin Cell Biol*, **12**, 475-482.
- Dougherty, W.G., Carrington, J.C., Cary, S.M. and Parks, T.D. (1988) Biochemical and mutational analysis of a plant virus polyprotein cleavage site. *Embo J*, **7**, 1281-1287.
- Durr, K.L., Tavrax, N.N., Zimmermann, D., Bamberg, E. and Friedrich, T. (2008) Characterization of Na,K-ATPase and H,K-ATPase enzymes with glycosylation-deficient beta-subunit variants by voltage-clamp fluorometry in *Xenopus* oocytes. *Biochemistry*, **47**, 4288-4297.
- Ekberg, K., Palmgren, M.G., Veierskov, B. and Buch-Pedersen, M.J. (2010) A novel mechanism of P-type ATPase autoinhibition involving both termini of the protein. *J Biol Chem*, **285**, 7344-7350.
- Emoto, K. and Umeda, M. (2000) An essential role for a membrane lipid in cytokinesis. Regulation of contractile ring disassembly by redistribution of phosphatidylethanolamine. *J Cell Biol*, **149**, 1215-1224.
- Ezanno, P., Cribier, S. and Devaux, P.F. (2010) Asymmetrical stress generated by the erythrocyte lipid flippase triggers multiple bud formation on the surface of spherical giant liposomes. *Eur Biophys J*, **39**, 1277-1280.

- Fadok, V.A., Bratton, D.L., Rose, D.M., Pearson, A., Ezekewitz, R.A. and Henson, P.M. (2000) A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature*, **405**, 85-90.
- Fan, B. and Rosen, B.P. (2002) Biochemical characterization of CopA, the Escherichia coli Cu(I)-translocating P-type ATPase. *J Biol Chem*, **277**, 46987-46992.
- Farge, E., Ojcius, D.M., Subtil, A. and Dautry-Varsat, A. (1999) Enhancement of endocytosis due to aminophospholipid transport across the plasma membrane of living cells. *Am J Physiol*, **276**, C725-733.
- Flamant, S., Pescher, P., Lemercier, B., Clement-Ziza, M., Kepes, F., Fellous, M., Milon, G., Marchal, G. and Besmond, C. (2003) Characterization of a putative type IV aminophospholipid transporter P-type ATPase. *Mamm Genome*, **14**, 21-30.
- Flesch, F.M., Brouwers, J.F., Nievelstein, P.F., Verkleij, A.J., van Golde, L.M., Colenbrander, B. and Gadella, B.M. (2001) Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane. *J Cell Sci*, **114**, 3543-3555.
- Folmer, D.E., Elferink, R.P. and Paulusma, C.C. (2009) P4 ATPases - lipid flippases and their role in disease. *Biochim Biophys Acta*, **1791**, 628-635.
- Furuta, N., Fujimura-Kamada, K., Saito, K., Yamamoto, T. and Tanaka, K. (2007) Endocytic recycling in yeast is regulated by putative phospholipid translocases and the Ypt31p/32p-Rcy1p pathway. *Mol Biol Cell*, **18**, 295-312.
- Gall, W.E., Geething, N.C., Hua, Z., Ingram, M.F., Liu, K., Chen, S.I. and Graham, T.R. (2002) Drs2p-dependent formation of exocytic clathrin-coated vesicles in vivo. *Curr Biol*, **12**, 1623-1627.
- Geering, K. (2001) The functional role of beta subunits in oligomeric P-type ATPases. *J Bioenerg Biomembr*, **33**, 425-438.
- Geering, K., Beguin, P., Garty, H., Karlish, S., Fuzesi, M., Horisberger, J.D. and Crambert, G. (2003) FXYD proteins: new tissue- and isoform-specific regulators of Na,K-ATPase. *Ann N Y Acad Sci*, **986**, 388-394.
- Gietz, R.D., Schiestl, R.H., Willems, A.R. and Woods, R.A. (1995) Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast*, **11**, 355.
- Gomes, E., Jakobsen, M.K., Axelsen, K.B., Geisler, M. and Palmgren, M.G. (2000) Chilling tolerance in Arabidopsis involves ALA1, a member of a new family of putative aminophospholipid translocases. *Plant Cell*, **12**, 2441-2454.
- Gong, E.Y., Park, E., Lee, H.J. and Lee, K. (2009) Expression of Atp8b3 in murine testis and its characterization as a testis specific P-type ATPase. *Reproduction*, **137**, 345-351.
- Gonzalez-Guerrero, M., Hong, D. and Arguello, J.M. (2009) Chaperone-mediated Cu⁺ delivery to Cu⁺ transport ATPases: requirement of nucleotide binding. *J Biol Chem*, **284**, 20804-20811.
- Gordesky, S.E. and Marinetti, G.V. (1973) The asymmetric arrangement of phospholipids in the human erythrocyte membrane. *Biochem Biophys Res Commun*, **50**, 1027-1031.
- Gorter, E. and Grendel, F. (1925) On Bimolecular Layers of Lipoids on the Chromocytes of the Blood. *J Exp Med*, **41**, 439-443.
- Gourdon, P., Liu, X.Y., Skjorringe, T., Morth, J.P., Moller, L.B., Pedersen, B.P. and Nissen, P. (2011) Crystal structure of a copper-transporting PIB-type ATPase. *Nature*, **475**, 59-64.
- Halter, D., Neumann, S., van Dijk, S.M., Wolthoorn, J., de Maziere, A.M., Vieira, O.V., Mattjus, P., Klumperman, J., van Meer, G. and Sprong, H. (2007) Pre- and post-Golgi translocation of glucosylceramide in glycosphingolipid synthesis. *J Cell Biol*, **179**, 101-115.
- Hannun, Y.A., Loomis, C.R. and Bell, R.M. (1986) Protein kinase C activation in mixed micelles. Mechanistic implications of phospholipid, diacylglycerol, and calcium interdependencies. *J Biol Chem*, **261**, 7184-7190.
- Harper, J.F., Hong, B., Hwang, I., Guo, H.Q., Stoddard, R., Huang, J.F., Palmgren, M.G., SZE, H. (1998) A novel calmodulin-regulated Ca²⁺-ATPase (ACA2) from Arabidopsis with an N-terminal autoinhibitory domain. *J Biol Chem*, **273**, 1099-1106.

- Harris, M.J. and Arias, I.M. (2003) FIC1, a P-type ATPase linked to cholestatic liver disease, has homologues (ATP8B2 and ATP8B3) expressed throughout the body. *Biochim Biophys Acta*, **1633**, 127-131.
- Hasler, U., Crambert, G., Horisberger, J.D. and Geering, K. (2001) Structural and functional features of the transmembrane domain of the Na,K-ATPase beta subunit revealed by tryptophan scanning. *J Biol Chem*, **276**, 16356-16364.
- Hasselbach, W. (1978) The reversibility of the sarcoplasmic calcium pump. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*, **515**, 23-53.
- Hauser, H. (2000) Short-chain phospholipids as detergents. *Biochim Biophys Acta*, **1508**, 164-181.
- Hicks, A.A., Pramstaller, P.P., Johansson, A., Vitart, V., Rudan, I., Ugocsai, P., Aulchenko, Y., Franklin, C.S., Liebisch, G., Erdmann, J., Jonasson, I., Zorkoltseva, I.V., Pattaro, C., Hayward, C., Isaacs, A., Hengstenberg, C., Campbell, S., Gnewuch, C., Janssens, A.C., Kirichenko, A.V., König, I.R., Marroni, F., Polasek, O., Demirkan, A., Kolcic, I., Schwienbacher, C., Igl, W., Biloglav, Z., Witteman, J.C., Pichler, I., Zabolli, G., Axenovich, T.I., Peters, A., Schreiber, S., Wichmann, H.E., Schunkert, H., Hastie, N., Oostra, B.A., Wild, S.H., Meitinger, T., Gyllenstein, U., van Duijn, C.M., Wilson, J.F., Wright, A., Schmitz, G. and Campbell, H. (2009) Genetic determinants of circulating sphingolipid concentrations in European populations. *PLoS Genet*, **5**, e1000672.
- Hobbs, A.S., Froehlich, J.P. and Albers, R.W. (1980) Inhibition by vanadate of the reactions catalyzed by the (Na⁺ + K⁺)-stimulated ATPase. A transient state kinetic characterization. *J Biol Chem*, **255**, 5724-5727.
- Holthuis, J.C. and Levine, T.P. (2005) Lipid traffic: floppy drives and a superhighway. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 209-220.
- Holthuis, J.C., Nichols, B.J., Dhruvakumar, S. and Pelham, H.R. (1998) Two syntaxin homologues in the TGN/endosomal system of yeast. *Embo J*, **17**, 113-126.
- Holthuis, J.C., Pomorski, T., Raggars, R.J., Sprong, H. and Van Meer, G. (2001) The organizing potential of sphingolipids in intracellular membrane transport. *Physiol Rev*, **81**, 1689-1723.
- Hua, Z., Fatheddin, P. and Graham, T.R. (2002) An essential subfamily of Drs2p-related P-type ATPases is required for protein trafficking between Golgi complex and endosomal/vacuolar system. *Mol Biol Cell*, **13**, 3162-3177.
- Hua, Z. and Graham, T.R. (2003) Requirement for neo1p in retrograde transport from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell*, **14**, 4971-4983.
- Iwamoto, K., Kobayashi, S., Fukuda, R., Umeda, M., Kobayashi, T. and Ohta, A. (2004) Local exposure of phosphatidylethanolamine on the yeast plasma membrane is implicated in cell polarity. *Genes Cells*, **9**, 891-903.
- Jacquot, A., Montigny, C., Hennrich, H., Barry, R., le Maire, M., Jaxel, C., Holthuis, J., Champeil, P. and Lenoir, G. (2012) Stimulation by phosphatidylserine of Drs2p/Cdc50p lipid translocase dephosphorylation is controlled by phosphatidylinositol-4-phosphate. *J Biol Chem*.
- Jidenko, M., Lenoir, G., Fuentes, J.M., le Maire, M. and Jaxel, C. (2006) Expression in yeast and purification of a membrane protein, SERCA1a, using a biotinylated acceptor domain. *Protein Expr Purif*, **48**, 32-42.
- Jidenko, M., Nielsen, R.C., Sorensen, T.L., Moller, J.V., le Maire, M., Nissen, P. and Jaxel, C. (2005) Crystallization of a mammalian membrane protein overexpressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 11687-11691.
- Kato, U., Emoto, K., Fredriksson, C., Nakamura, H., Ohta, A., Kobayashi, T., Murakami-Murofushi, K., Kobayashi, T. and Umeda, M. (2002) A novel membrane protein, Ros3p, is required for phospholipid translocation across the plasma membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **277**, 37855-37862.
- Kawamura, T., Higuchi, W., Emoto, Y. and Tawada, K. (1985) Relationship between the ATPase activity and the ATP-induced fluorescence enhancement of SH-modified heavy meromyosin

- during its fractional inactivation by vanadate plus ADP: evidence for heterogeneity in the active sites. *J Biochem*, **97**, 1583-1593.
- Klomp, L.W., Vargas, J.C., van Mil, S.W., Pawlikowska, L., Strautnieks, S.S., van Eijk, M.J., Juijn, J.A., Pabon-Pena, C., Smith, L.B., DeYoung, J.A., Byrne, J.A., Gombert, J., van der Brugge, G., Berger, R., Jankowska, I., Pawlowska, J., Villa, E., Knisely, A.S., Thompson, R.J., Freimer, N.B., Houwen, R.H. and Bull, L.N. (2004) Characterization of mutations in ATP8B1 associated with hereditary cholestasis. *Hepatology*, **40**, 27-38.
- Kol, M.A., van Laak, A.N., Rijkers, D.T., Killian, J.A., de Kroon, A.I. and de Kruijff, B. (2003) Phospholipid flop induced by transmembrane peptides in model membranes is modulated by lipid composition. *Biochemistry*, **42**, 231-237.
- Kubota, T., Daiho, T. and Kanazawa, T. (1993) Quasi-irreversible inactivation of the sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase by simultaneous tight binding of magnesium and fluoride to the catalytic site. *Biochim Biophys Acta*, **1163**, 131-143.
- Kuhlbrandt, W. (2004) Biology, Structure and Mechanism of P-type ATPases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **5**, 282-295.
- Laemmli, U. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- le Maire, M., Arnou, B., Olesen, C., Georgin, D., Ebel, C. and Moller, J.V. (2008) Gel chromatography and analytical ultracentrifugation to determine the extent of detergent binding and aggregation, and Stokes radius of membrane proteins using sarcoplasmic reticulum Ca2+-ATPase as an example. *Nat Protoc*, **3**, 1782-1795.
- Lenoir, G., Menguy, T., Corre, F., Montigny, C., Pedersen, P.A., Thines, D., le Maire, M. and Falson, P. (2002) Overproduction in yeast and rapid and efficient purification of the rabbit SERCA1a Ca(2+)-ATPase. *Biochim Biophys Acta*, **1560**, 67-83.
- Lenoir, G., Picard M., Moller J.V., le Maire M., Champeil P., Falson P. (2004) Involvement of the L6-7 loop in SERCA1a Ca2+-ATPase activation by Ca2+ (or Sr2+) and ATP. *J Biol Chem*, **279**, 32125-32133.
- Lenoir, G., Williamson, P., Puts, C.F. and Holthuis, J.C. (2009) Cdc50p plays a vital role in the ATPase reaction cycle of the putative aminophospholipid transporter drs2p. *J Biol Chem*, **284**, 17956-17967.
- Lentz, B.R. (2003) Exposure of platelet membrane phosphatidylserine regulates blood coagulation. *Prog Lipid Res*, **42**, 423-438.
- Li, H., Wetten, S., Li, L., St Jean, P.L., Upmanyu, R., Surh, L., Hosford, D., Barnes, M.R., Briley, J.D., Borrie, M., Coletta, N., Delisle, R., Dhalla, D., Ehm, M.G., Feldman, H.H., Fornazzari, L., Gauthier, S., Goodgame, N., Guzman, D., Hammond, S., Hollingworth, P., Hsiung, G.Y., Johnson, J., Kelly, D.D., Keren, R., Kertesz, A., King, K.S., Lovestone, S., Loy-English, I., Matthews, P.M., Owen, M.J., Plumpton, M., Pryse-Phillips, W., Prinjha, R.K., Richardson, J.C., Saunders, A., Slater, A.J., St George-Hyslop, P.H., Stinnett, S.W., Swartz, J.E., Taylor, R.L., Wherrett, J., Williams, J., Yarnall, D.P., Gibson, R.A., Irizarry, M.C., Middleton, L.T. and Roses, A.D. (2008) Candidate single-nucleotide polymorphisms from a genomewide association study of Alzheimer disease. *Arch Neurol*, **65**, 45-53.
- Liu, K., Surendhran, K., Nothwehr, S.F. and Graham, T.R. (2008) P4-ATPase requirement for AP-1/clathrin function in protein transport from the trans-Golgi network and early endosomes. *Mol Biol Cell*, **19**, 3526-3535.
- Liu, K., Zhang, X., Lester, R.L. and Dickson, R.C. (2005) The sphingoid long chain base phytosphingosine activates AGC-type protein kinases in *Saccharomyces cerevisiae* including Ypk1, Ypk2, and Sch9. *J Biol Chem*, **280**, 22679-22687.
- Lopez-Marques, R.L., Holthuis, J.C. and Pomorski, T.G. (2011) Pumping lipids with P4-ATPases. *Biol Chem*, **392**, 67-76.

- Lopez-Marques, R.L., Poulsen, L.R., Hanisch, S., Meffert, K., Buch-Pedersen, M.J., Jakobsen, M.K., Pomorski, T.G. and Palmgren, M.G. (2010) Intracellular targeting signals and lipid specificity determinants of the ALA/ALIS P4-ATPase complex reside in the catalytic ALA alpha-subunit. *Mol Biol Cell*, **21**, 791-801.
- Lopez-Montero, I., Rodriguez, N., Cribier, S., Pohl, A., Velez, M. and Devaux, P.F. (2005) Rapid transbilayer movement of ceramides in phospholipid vesicles and in human erythrocytes. *J Biol Chem*, **280**, 25811-25819.
- Lutsenko, S. and Kaplan, J.H. (1993) An essential role for the extracellular domain of the Na,K-ATPase beta-subunit in cation occlusion. *Biochemistry*, **32**, 6737-6743.
- MacLennan, D.H., Asahi, M. and Tupling, A.R. (2003) The regulation of SERCA-type pumps by phospholamban and sarcolipin. *Ann N Y Acad Sci*, **986**, 472-480.
- MacLennan, D.H. and Kranias, E.G. (2003) Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 566-577.
- Menon, I., Huber, T., Sanyal, S., Banerjee, S., Barre, P., Canis, S., Warren, J.D., Hwa, J., Sakmar, T.P. and Menon, A.K. (2011) Opsin is a phospholipid flippase. *Curr Biol*, **21**, 149-153.
- Mercer, J. and Helenius, A. (2008) Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells. *Science*, **320**, 531-535.
- Merlot, S., Leonhardt, N., Fenzi, F., Valon, C., Costa, M., Piette, L., Vavasseur, A., Genty, B., Boivin, K., Muller, A., Giraudat, J. and Leung, J. (2007) Constitutive activation of a plasma membrane H(+)-ATPase prevents abscisic acid-mediated stomatal closure. *Embo J*, **26**, 3216-3226.
- Møller, J.V., Juul, B. and le Maire, M. (1996) Structural organization, ion transport, and energy transduction of P-type ATPases. *Biochim Biophys Acta*, **1286**, 1-51.
- Morth, J.P., Pedersen, B.P., Toustrup-Jensen, M.S., Sorensen, T.L., Petersen, J., Andersen, J.P., Vilsen, B. and Nissen, P. (2007) Crystal structure of the sodium-potassium pump. *Nature*, **450**, 1043-1049.
- Murphy, A.J. and Coll, R.J. (1992a) Fluoride is a slow, tight-binding inhibitor of the calcium ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, **267**, 5229-5235.
- Murphy, A.J. and Coll, R.J. (1992b) Fluoride binding to the calcium ATPase of sarcoplasmic reticulum converts its transport sites to a low affinity, lumen-facing form. *J Biol Chem*, **267**, 16990-16994.
- Murphy, A.J. and Coll, R.J. (1993) Formation of a stable inactive complex of the sarcoplasmic reticulum calcium ATPase with magnesium, beryllium, and fluoride. *J Biol Chem*, **268**, 23307-23310.
- Muthusamy, B.P., Raychaudhuri, S., Natarajan, P., Abe, F., Liu, K., Prinz, W.A. and Graham, T.R. (2009) Control of protein and sterol trafficking by antagonistic activities of a type IV P-type ATPase and oxysterol binding protein homologue. *Mol Biol Cell*, **20**, 2920-2931.
- Natarajan, P., Liu, K., Patil, D.V., Sciorra, V.A., Jackson, C.L. and Graham, T.R. (2009) Regulation of a Golgi flippase by phosphoinositides and an ArfGEF. *Nat Cell Biol*, **11**, 1421-1426.
- Natarajan, P., Wang, J., Hua, Z. and Graham, T.R. (2004) Drs2p-coupled aminophospholipid translocase activity in yeast Golgi membranes and relationship to in vivo function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 10614-10619.
- Noji, T., Yamamoto, T., Saito, K., Fujimura-Kamada, K., Kondo, S. and Tanaka, K. (2006) Mutational analysis of the Lem3p-Dnf1p putative phospholipid-translocating P-type ATPase reveals novel regulatory roles for Lem3p and a carboxyl-terminal region of Dnf1p independent of the phospholipid-translocating activity of Dnf1p in yeast. *Biochem Biophys Res Commun*, **344**, 323-331.
- Obara, K., Miyashita, N., Xu, C., Toyoshima, I., Sugita, Y., Inesi, G. and Toyoshima, C. (2005) Structural role of countertransport revealed in Ca²⁺ pump crystal structure in the absence of Ca²⁺. *PNAS*, **102**, 14489-14496.

- Olesen, C., Picard, M., Winther, A.M., Gyru, C., Morth, J.P., Oxvig, C., Møller, J.V. and Nissen, P. (2007) The structural basis of calcium transport by the calcium pump. *Nature*, **450**, 1036-1042.
- Palmgren, M.G. and Nissen, P. (2011) P-type ATPases. *Annu Rev Biophys*, **40**, 243-266.
- Papadopoulos, A., Vehring, S., Lopez-Montero, I., Kutschenko, L., Stockl, M., Devaux, P.F., Kozlov, M., Pomorski, T. and Herrmann, A. (2007) Flippase activity detected with unlabeled lipids by shape changes of giant unilamellar vesicles. *J Biol Chem*, **282**, 15559-15568.
- Parks, T.D., Leuther, K.K., Howard, E.D., Johnston, S.A. and Dougherty, W.G. (1994) Release of proteins and peptides from fusion proteins using a recombinant plant virus proteinase. *Anal Biochem*, **216**, 413-417.
- Paterson, J.K., Renkema, K., Burden, L., Halleck, M.S., Schlegel, R.A., Williamson, P. and Daleke, D.L. (2006) Lipid specific activation of the murine P4-ATPase Atp8a1 (ATPase II). *Biochemistry*, **45**, 5367-5376.
- Paulusma, C.C. and Elferink, R.P. (2010) P4 ATPases--the physiological relevance of lipid flipping transporters. *FEBS Lett*, **584**, 2708-2716.
- Paulusma, C.C., Folmer, D.E., Ho-Mok, K.S., de Waart, D.R., Hilarius, P.M., Verhoeven, A.J. and Oude Elferink, R.P. (2008) ATP8B1 requires an accessory protein for endoplasmic reticulum exit and plasma membrane lipid flippase activity. *Hepatology*, **47**, 268-278.
- Paulusma, C.C., Groen, A., Kunne, C., Ho-Mok, K.S., Spijkerboer, A.L., Rudi de Waart, D., Hoek, F.J., Vreeling, H., Hoeben, K.A., van Marle, J., Pawlikowska, L., Bull, L.N., Hofmann, A.F., Knisely, A.S. and Oude Elferink, R.P. (2006) Atp8b1 deficiency in mice reduces resistance of the canalicular membrane to hydrophobic bile salts and impairs bile salt transport. *Hepatology*, **44**, 195-204.
- Paulusma, C.C. and Oude Elferink, R.P. (2005) The type 4 subfamily of P-type ATPases, putative aminophospholipid translocases with a role in human disease. *Biochim Biophys Acta*, **1741**, 11-24.
- Pedersen, B.P., Buch-Pedersen, M.J., Morth, J.P., Palmgren, M.G. and Nissen, P. (2007) Crystal structure of the plasma membrane proton pump. *Nature*, **450**, 1111-1114.
- Perez-Victoria, F.J., Sanchez-Canete, M.P., Castanys, S. and Gamarro, F. (2006) Phospholipid translocation and miltefosine potency require both L. donovani miltefosine transporter and the new protein LdRos3 in Leishmania parasites. *J Biol Chem*, **281**, 23766-23775.
- Petris, M.J., Mercer, J.F., Culvenor, J.G., Lockhart, P., Gleeson, P.A. and Camakaris, J. (1996) Ligand-regulated transport of the Menkes copper P-type ATPase efflux pump from the Golgi apparatus to the plasma membrane: a novel mechanism of regulated trafficking. *Embo J*, **15**, 6084-6095.
- Picard, M., Dahmane, T., Garrigos, M., Gauron, C., Giusti, F., le Maire, M., Popot, J. and Champeil, P. (2006a) Protective and inhibitory effects of various types of amphipols on the Ca²⁺-ATPase from sarcoplasmic reticulum: a comparative study. *Biochemistry*, **45**, 1861-1869.
- Picard, M., Jensen, A.-M.L., Sørensen, T.L.-M., Champeil, P., Møller, J.V. and Nissen, P. (2007) Ca²⁺ versus Mg²⁺ Coordination at the Nucleotide-binding site of the Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase. *Journal of Molecular Biology*, **368**, 1-7.
- Picard, M., Toyoshima, C. and Champeil, P. (2006b) Effects of Inhibitors on Luminal Opening of Ca²⁺ Binding Sites in an E2P-like Complex of Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase with Be²⁺-fluoride. *J. Biol. Chem.*, **281**, 3360-3369.
- Pick, U. (1982) The interaction of vanadate ions with the Ca-ATPase from sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, **257**, 6111-6119.
- Pomorski, T., Lombardi, R., Riezman, H., Devaux, P.F., van Meer, G. and Holthuis, J.C. (2003) Drs2p-related P-type ATPases Dnf1p and Dnf2p are required for phospholipid translocation across the yeast plasma membrane and serve a role in endocytosis. *Mol Biol Cell*, **14**, 1240-1254.

- Pompon, D., Louerat, B., Bronine, A. and Urban, P. (1996) Yeast expression of animal and plant P450s in optimized redox environments. *Methods Enzymol*, **272**, 51-64.
- Portillo, F. (2000) Genetic characterization of the (534)DPPR motif of the yeast plasma membrane H(+)-ATPase. *Biochim Biophys Acta*, **1468**, 99-106.
- Portillo, F., de Larrinoa, I.F. and Serrano, R. (1989) Deletion analysis of yeast plasma membrane H⁺-ATPase and identification of a regulatory domain at the carboxyl-terminus. *FEBS Lett*, **247**, 381-385.
- Poulsen, L.R., Lopez-Marques, R.L., McDowell, S.C., Okkeri, J., Licht, D., Schulz, A., Pomorski, T., Harper, J.F. and Palmgren, M.G. (2008a) The Arabidopsis P4-ATPase ALA3 localizes to the golgi and requires a beta-subunit to function in lipid translocation and secretory vesicle formation. *Plant Cell*, **20**, 658-676.
- Poulsen, L.R., Lopez-Marques, R.L. and Palmgren, M.G. (2008b) Flippases: still more questions than answers. *Cell Mol Life Sci*, **65**, 3119-3125.
- Pouny, Y., Weitzman, C. and Kaback, H.R. (1998) In vitro biotinylation provides quantitative recovery of highly purified active lactose permease in a single step. *Biochemistry*, **37**, 15713-15719.
- Puts, C.F. and Holthuis, J.C. (2009) Mechanism and significance of P(4) ATPase-catalyzed lipid transport: Lessons from a Na(+)/K(+)-pump. *Biochim Biophys Acta*, **1791**, 603-611.
- Puts, C.F., Lenoir, G., Krijgsveld, J., Williamson, P. and Holthuis, J.C. (2010) A P4-ATPase protein interaction network reveals a link between aminophospholipid transport and phosphoinositide metabolism. *J Proteome Res*, **9**, 833-842.
- Puts, C.F., Panatala, R., Hennrich, H., Tsareva, A., Williamson, P. and Holthuis, J.C. (2012) Mapping functional interactions in a heterodimeric phospholipid pump. *J Biol Chem*, **287**, 30529-30540.
- Riekhof, W.R. and Voelker, D.R. (2006) Uptake and utilization of lyso-phosphatidylethanolamine by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **281**, 36588-36596.
- Riekhof, W.R., Wu, J., Gijon, M.A., Zarini, S., Murphy, R.C. and Voelker, D.R. (2007) Lysophosphatidylcholine metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of P-type ATPases in transport and a broad specificity acyltransferase in acylation. *J Biol Chem*, **282**, 36853-36861.
- Roelants, F.M., Baltz, A.G., Trott, A.E., Fereres, S. and Thorner, J. (2010) A protein kinase network regulates the function of aminophospholipid flippases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 34-39.
- Ruad, A.F., Nilsson, L., Richard, F., Larsen, M.K., Bessereau, J.L. and Tuck, S. (2009) The *C. elegans* P4-ATPase TAT-1 regulates lysosome biogenesis and endocytosis. *Traffic*, **10**, 88-100.
- Saito, K., Fujimura-Kamada, K., Furuta, N., Kato, U., Umeda, M. and Tanaka, K. (2004) Cdc50p, a protein required for polarized growth, associates with the Drs2p P-type ATPase implicated in phospholipid translocation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, **15**, 3418-3432.
- Sakane, H., Yamamoto, T. and Tanaka, K. (2006) The functional relationship between the Cdc50p-Drs2p putative aminophospholipid translocase and the Arf GAP Gcs1p in vesicle formation in the retrieval pathway from yeast early endosomes to the TGN. *Cell Struct Funct*, **31**, 87-108.
- Sangiorgio, V., Pitto, M., Palestini, P. and Masserini, M. (2004) GPI-anchored proteins and lipid rafts. *Ital J Biochem*, **53**, 98-111.
- Sarkadi, B., Enyedi, A., Foldes-Papp, Z. and Gardos, G. (1986) Molecular characterization of the in situ red cell membrane calcium pump by limited proteolysis. *J. Biol. Chem.*, **261**, 9552-9557.
- Seigneuret, M. and Devaux, P.F. (1984) ATP-dependent asymmetric distribution of spin-labeled phospholipids in the erythrocyte membrane: relation to shape changes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81**, 3751-3755.
- Siegmund, A., Grant, A., Angeletti, C., Malone, L., Nichols, J.W. and Rudolph, H.K. (1998) Loss of Drs2p does not abolish transfer of fluorescence-labeled phospholipids across the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **273**, 34399-34405.

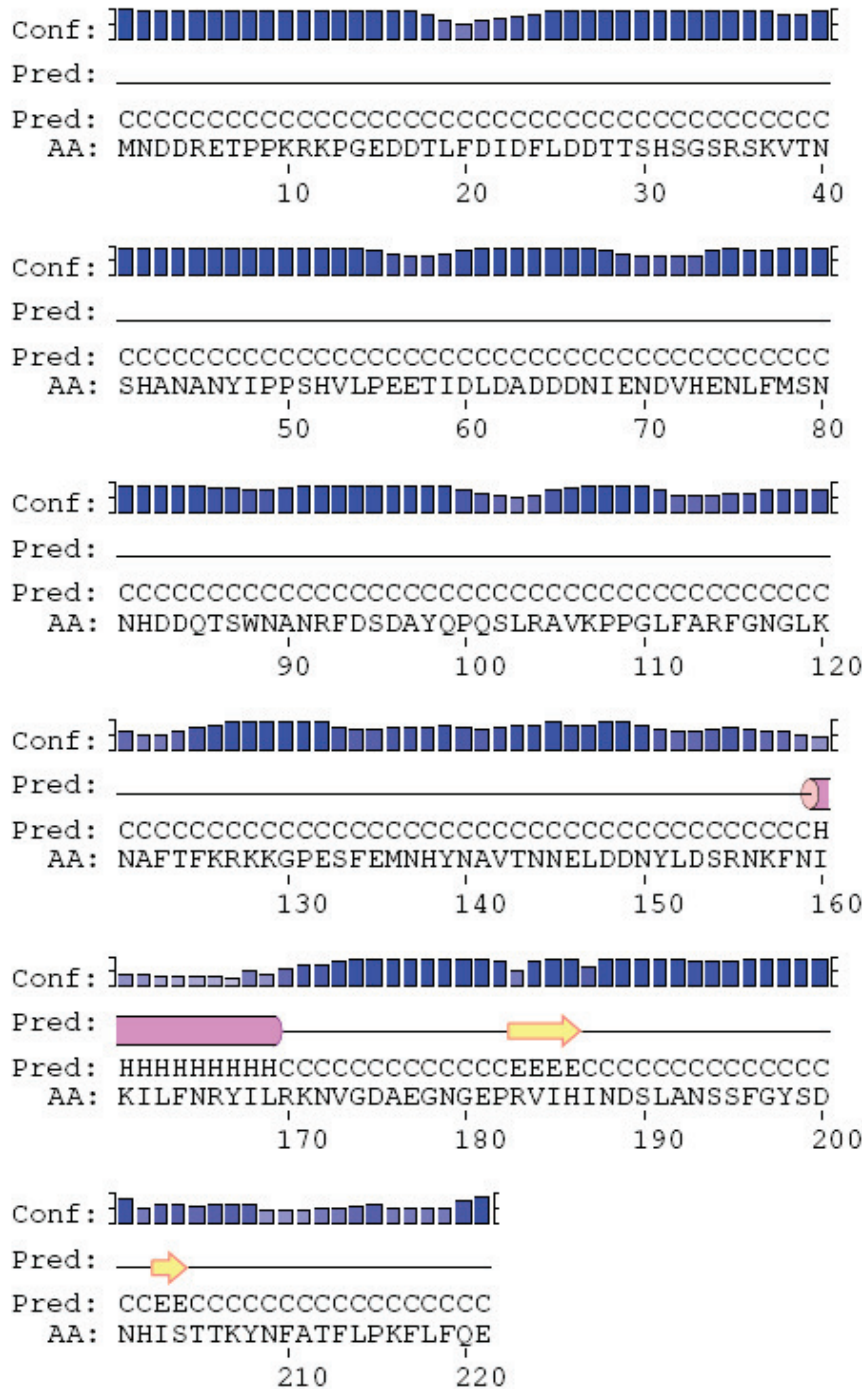
- Siggs, O.M., Arnold, C.N., Huber, C., Pirie, E., Xia, Y., Lin, P., Nemazee, D. and Beutler, B. (2011a) The P4-type ATPase ATP11C is essential for B lymphopoiesis in adult bone marrow. *Nat Immunol*, **12**, 434-440.
- Siggs, O.M., Schnabl, B., Webb, B. and Beutler, B. (2011b) X-linked cholestasis in mouse due to mutations of the P4-ATPase ATP11C. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**, 7890-7895.
- Singer, S.J. and Nicolson, G.L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, **175**, 720-731.
- Skou, J.C. (1957) The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochim Biophys Acta*, **23**, 394-401.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. and Klenk, D.C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, **150**, 76-85.
- Sorensen, D.M., Buch-Pedersen, M.J. and Palmgren, M.G. (2010) Structural divergence between the two subgroups of P5 ATPases. *Biochim Biophys Acta*, **1797**, 846-855.
- Soupene, E., Kemaladewi, D.U. and Kuypers, F.A. (2008) ATP8A1 activity and phosphatidylserine transbilayer movement. *J Receptor Ligand Channel Res*, **1**, 1-10.
- Stapelbroek, J.M., Peters, T.A., van Beurden, D.H., Curfs, J.H., Joosten, A., Beynon, A.J., van Leeuwen, B.M., van der Velden, L.M., Bull, L., Oude Elferink, R.P., van Zanten, B.A., Klomp, L.W. and Houwen, R.H. (2009) ATP8B1 is essential for maintaining normal hearing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 9709-9714.
- Stevens, H.C. and Nichols, J.W. (2007) The proton electrochemical gradient across the plasma membrane of yeast is necessary for phospholipid flip. *J Biol Chem*, **282**, 17563-17567.
- Stone, A. and Williamson, P. (2012) Outside of the box: recent news about phospholipid translocation by P4 ATPases. *J Chem Biol*.
- Takahashi, Y., Fujimura-Kamada, K., Kondo, S. and Tanaka, K. (2011) Isolation and characterization of novel mutations in CDC50, the non-catalytic subunit of the Drs2p phospholipid flippase. *J Biochem*, **149**, 423-432.
- Takatsu, H., Baba, K., Shima, T., Umino, H., Kato, U., Umeda, M., Nakayama, K. and Shin, H.W. (2011) ATP9B, a P4-ATPase (a putative aminophospholipid translocase), localizes to the trans-Golgi network in a CDC50 protein-independent manner. *J Biol Chem*, **286**, 38159-38167.
- Tan, S., Tan, H.T. and Chung, M.C. (2008) Membrane proteins and membrane proteomics. *Proteomics*, **8**, 3924-3932.
- Tanaka, K., Fujimura-Kamada, K. and Yamamoto, T. (2010) Functions of phospholipid flippases. *J Biochem*, **149**, 131-143.
- Tang, X., Halleck, M.S., Schlegel, R.A. and Williamson, P. (1996) A subfamily of P-type ATPases with aminophospholipid transporting activity. *Science*, **272**, 1495-1497.
- Tanzi, R.E., Petrukhin, K., Chernov, I., Pellequer, J.L., Wasco, W., Ross, B., Romano, D.M., Parano, E., Pavone, L., Brzustowicz, L.M. and et al. (1993) The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene. *Nat Genet*, **5**, 344-350.
- Toyoshima, C. (2007) Ion pumping by calcium ATPase of sarcoplasmic reticulum. *Adv Exp Med Biol*, **592**, 295-303.
- Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H. and Ogawa, H. (2000) Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature*, **405**, 647-655.
- Toyoshima, C., Norimatsu, Y., Iwasawa, S., Tsuda, T. and Ogawa, H. (2007) How processing of aspartylphosphate is coupled to luminal gating of the ion pathway in the calcium pump. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**, 19831-19836.
- Troullier, A., Girardet, J.L. and Dupont, Y. (1992) Fluoroaluminate complexes are bifunctional analogues of phosphate in sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase. *J Biol Chem*, **267**, 22821-22829.

- Tsivkovskii, R., MacArthur, B.C. and Lutsenko, S. (2001) The Lys1010-Lys1325 fragment of the Wilson's disease protein binds nucleotides and interacts with the N-terminal domain of this protein in a copper-dependent manner. *J Biol Chem*, **276**, 2234-2242.
- Ujhazy, P., Ortiz, D., Misra, S., Li, S., Moseley, J., Jones, H. and Arias, I.M. (2001) Familial intrahepatic cholestasis 1: studies of localization and function. *Hepatology*, **34**, 768-775.
- van den Eijnde, S.M., van den Hoff, M.J., Reutelingsperger, C.P., van Heerde, W.L., Henfling, M.E., Vermeij-Keers, C., Schutte, B., Borgers, M. and Ramaekers, F.C. (2001) Transient expression of phosphatidylserine at cell-cell contact areas is required for myotube formation. *J Cell Sci*, **114**, 3631-3642.
- van der Velden, L.M., Wichers, C.G., van Breevoort, A.E., Coleman, J.A., Molday, R.S., Berger, R., Klomp, L.W. and van de Graaf, S.F. (2010) Heteromeric interactions required for abundance and subcellular localization of human CDC50 proteins and class 1 P4-ATPases. *J Biol Chem*, **285**, 40088-40096.
- Verhulst, P.M., van der Velden, L.M., Oorschot, V., van Faassen, E.E., Klumperman, J., Houwen, R.H., Pomorski, T.G., Holthuis, J.C. and Klomp, L.W. (2010) A flippase-independent function of ATP8B1, the protein affected in familial intrahepatic cholestasis type 1, is required for apical protein expression and microvillus formation in polarized epithelial cells. *Hepatology*, **51**, 2049-2060.
- Verkleij, A.J., Zwaal, R.F., Roelofsen, B., Comfurius, P., Kastelijn, D. and van Deenen, L.L. (1973) The asymmetric distribution of phospholipids in the human red cell membrane. A combined study using phospholipases and freeze-etch electron microscopy. *Biochim Biophys Acta*, **323**, 178-193.
- Vicinanza, M., D'Angelo, G., Di Campli, A. and De Matteis, M.A. (2008) Phosphoinositides as regulators of membrane trafficking in health and disease. *Cell Mol Life Sci*, **65**, 2833-2841.
- Vulpe, C., Levinson, B., Whitney, S., Packman, S. and Gitschier, J. (1993) Isolation of a candidate gene for Menkes disease and evidence that it encodes a copper-transporting ATPase. *Nat Genet*, **3**, 7-13.
- Wach, A., Brachat, A., Alberti-Segui, C., Rebischung, C. and Philippsen, P. (1997) Heterologous HIS3 marker and GFP reporter modules for PCR-targeting in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **13**, 1065-1075.
- Wang, J., Sun, H.Q., Macia, E., Kirchhausen, T., Watson, H., Bonifacino, J.S. and Yin, H.L. (2007) PI4P promotes the recruitment of the GGA adaptor proteins to the trans-Golgi network and regulates their recognition of the ubiquitin sorting signal. *Mol Biol Cell*, **18**, 2646-2655.
- Wang, L., Beserra, C. and Garbers, D.L. (2004) A novel aminophospholipid transporter exclusively expressed in spermatozoa is required for membrane lipid asymmetry and normal fertilization. *Dev Biol*, **267**, 203-215.
- Wang, Y.J., Wang, J., Sun, H.Q., Martinez, M., Sun, Y.X., Macia, E., Kirchhausen, T., Albanesi, J.P., Roth, M.G. and Yin, H.L. (2003) Phosphatidylinositol 4 phosphate regulates targeting of clathrin adaptor AP-1 complexes to the Golgi. *Cell*, **114**, 299-310.
- Whiteley, N.M. and Berg, H.C. (1974) Amidination of the outer and inner surfaces of the human erythrocyte membrane. *J Mol Biol*, **87**, 541-561.
- Wicky, S., Schwarz, H. and Singer-Kruger, B. (2004) Molecular interactions of yeast Neo1p, an essential member of the Drs2 family of aminophospholipid translocases, and its role in membrane trafficking within the endomembrane system. *Mol Cell Biol*, **24**, 7402-7418.
- Wu, C.C., Rice, W.J. and Stokes, D.L. (2008) Structure of a copper pump suggests a regulatory role for its metal-binding domain. *Structure*, **16**, 976-985.
- Xu, C., Zhang, X., Yu, C., Lu, G., Chen, S., Xu, L., Ding, W., Shi, Q. and Li, Y. (2009) Proteomic analysis of hepatic ischemia/reperfusion injury and ischemic preconditioning in mice revealed the protective role of ATP5beta. *Proteomics*, **9**, 409-419.

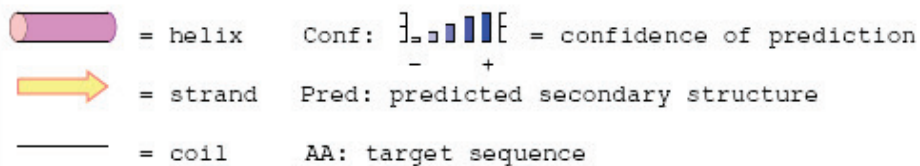
- Yabas, M., Teh, C.E., Frankenreiter, S., Lal, D., Roots, C.M., Whittle, B., Andrews, D.T., Zhang, Y., Teoh, N.C., Sprent, J., Tze, L.E., Kucharska, E.M., Kofler, J., Farrell, G.C., Broer, S., Goodnow, C.C. and Enders, A. (2011) ATP11C is critical for the internalization of phosphatidylserine and differentiation of B lymphocytes. *Nat Immunol*, **12**, 441-449.
- Yamasaki, K., Daiho, T. and Suzuki, H. (2002) Remarkable stability of solubilized and delipidated sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase with tightly bound fluoride and magnesium against detergent-induced denaturation. *J Biol Chem*, **277**, 13615-13619.
- Yeung, T., Gilbert, G.E., Shi, J., Silvius, J., Kapus, A. and Grinstein, S. (2008) Membrane phosphatidylserine regulates surface charge and protein localization. *Science*, **319**, 210-213.
- Zachowski, A. (1993) Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement. *Biochem J*, **294 (Pt 1)**, 1-14.
- Zachowski, A., Henry, J.P. and Devaux, P.F. (1989) Control of transmembrane lipid asymmetry in chromaffin granules by an ATP-dependent protein. *Nature*, **340**, 75-76.
- Zhou, X. and Graham, T.R. (2009) Reconstitution of phospholipid translocase activity with purified Drs2p, a type-IV P-type ATPase from budding yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 16586-16591.

Annexe1

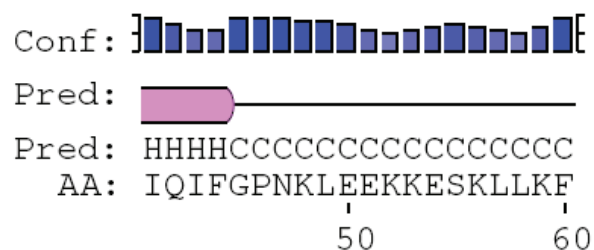
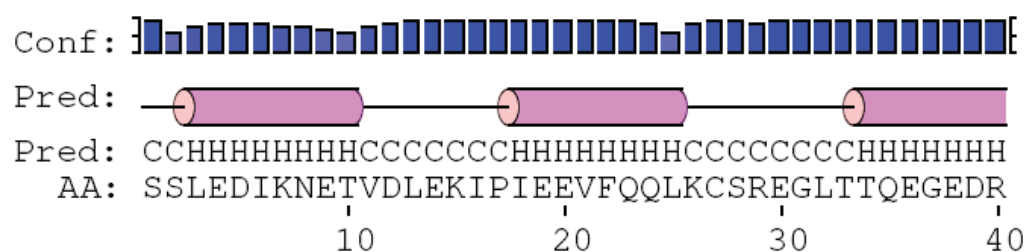
Prédiction de structure du N-terminal de Drs2p :



Legend:



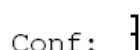
Prédiction de structure du N-terminal d'AH2 :



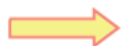
Legend:



= helix

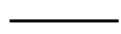


= confidence of prediction



= strand

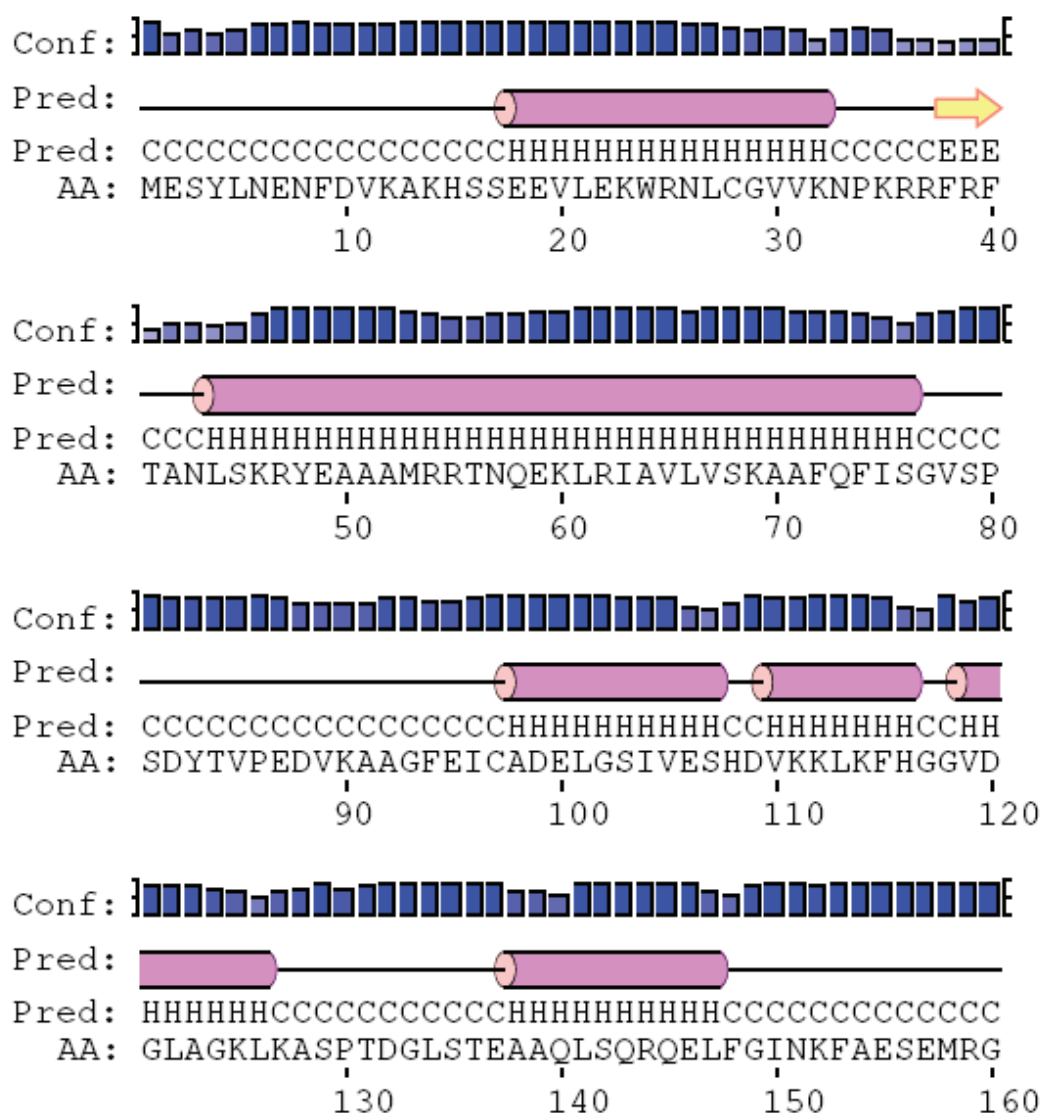
Pred: predicted secondary structure



= coil

AA: target sequence

Prédiction de structure du N-terminal d'ACA2 :




Legend:



= helix

Conf: = confidence of prediction



= strand

Pred: predicted secondary structure

= coil

AA: target sequence

Alignement de séquences des ATPases de type P4

Accession	Protein Name	Species	Length	Score	E-value
0	Q9L183	ALA10_ARATH			
0	Q9SAF5	ALA11_ARATH			
0	P57792	ALA12_ARATH			
0	P98204	ALA1_ARATH			
0	P98205	ALA2_ARATH			
0	Q9XIE6	ALA3_ARATH			
0	Q9LQN4	ALA4_ARATH			
0	Q9SGG3	ALA5_ARATH			
0	Q9SLK6	ALA6_ARATH			
0	Q9LVK9	ALA7_ARATH			
0	Q9LKV9	ALA8_ARATH			
0	Q9SX33	ALA9_ARATH			
0	O60312	AT10A_HUMAN			
0	O94823	AT10B_HUMAN			
0	Q9FP241	AT10D_HUMAN			
0	P98196	AT11A_HUMAN			
0	Q9Y2G3	AT11B_HUMAN			
0	Q8NB49	AT11C_HUMAN			
0	Q29449	AT8A1_BOVIN			
0	O54827	AT10A_MOUSE			
0	Q8K2X1	AT10D_MOUSE			
0	P98197	AT11A_MOUSE			
0	Q9NM024	AT11B_RABIT			
0	Q9QZW0	AT11C_MOUSE			
0	Q9Y2Q0	AT8A1_HUMAN			
0	P70704	AT8A1_MOUSE			
0	Q9NTI2	AT8A2_HUMAN			
0	P98200	AT8A2_MOUSE			
3	O43520	AT8B1_HUMAN			
3	Q148W0	AT8B1_MOUSE			
0	P98198	AT8B2_HUMAN			
0	P98199	AT8B2_MOUSE			
5	O60423	AT8B3_HUMAN			
0	Q8TF62	AT8B4_HUMAN			
0	A3FIM4	AT8B5_MOUSE			
94	P39524	ATC3_YEAST			
110	Q12675	ATC4_YEAST			
75	P32660	ATC5_YEAST			
74	P40527	ATC7_YEAST			
60	Q12674	ATC8_YEAST			
2	O75110	ATP9A_HUMAN			
2	O70228	ATP9A_MOUSE			
40	A1A476	ATP9B_BOVIN			
34	Q3861	ATP9B_HUMAN			
38	P98195	ATP9B_MOUSE			
39	D4AB88	ATP9B_RAT			

[illegible]

43 YCNPGSPAA-----RNNYAGNVYSTYIVASFFSLFQFNVANFYFLTGIIISLT-LSPYGVSALLPLALVISATMVGIGWRRKQQLIVNNRVVYVHG-- 147 Q9LI83 ALA10_ARATH
41 YCNPHSPAA-----RNNYVGVVYSTYTLASTFSLFQFNVANFYFLTGIVLSLT-ALSPYSPISALLPLFVIAASMYTAISDWGRKKQQLIMNNRVVYVHG-- 145 Q9SAF5 ALA11_ARATH
45 FCNQPSPFA-----SRNYCQNVYSTYTLATFLSLFQFNVANFYFLTGIIISLT-PLAPYTAASAIPLFVILATMFGVGDWRRKQQLIVNNRVVYVHG-- 149 P57792 ALA12_ARATH
71 YINPFTIN-----RFTFGNSITAYSVFTFLSLFQFNVANFYFLTGIVNLQPLAVFGASIMPLAFVLLVSATDAYEFRRRHSQQLIVNNRVVYVHG-- 175 P98204 ALA1_ARATH
6 YINPFTIN-----RFTFGNSITAYSVFTFLSLFQFNVANFYFLTGIVNLQPLAVFGASIMPLAFVLLVSATDAYEFRRRHSQQLIVNNRVVYVHG-- 175 P98205 ALA2_ARATH
39 YCNPHSP-----QVHFGNSISITTYNVFTFLSLFQFNVANFYFLTGIVNLQPLAVFGASIMPLAFVLLVSATDAYEFRRRHSQQLIVNNRVVYVHG-- 140 Q9XIE6 ALA3_ARATH
44 YCNQPMHFG-----PLVYSNVYSTTYNLITFFSLFQFNVANFYFLTAIISVFE-PLSPFNWSMIAPLVFVGLSMLDALDWRFFMQQVIVNARCVYVHG-- 148 Q9SLK4 ALA4_ARATH
44 FCNQPMLHFG-----PLVYSNVYSTTYNLITFFSLFQFNVANFYFLTAIISVFE-PLSPFNWSMIAPLVFVGLSMLDALDWRFFMQQVIVNARCVYVHG-- 148 Q9SGG3 ALA5_ARATH
44 YCNQPLHFG-----TLVYSNVYSTTYNLITFFSLFQFNVANFYFLTAIISVFE-PLSPFNWSMIAPLVFVGLSMLDALDWRFFMQQVIVNARCVYVHG-- 149 Q9SLK6 ALA6_ARATH
44 YCNQPLHFG-----TLVYSNVYSTTYNLITFFSLFQFNVANFYFLTAIISVFE-PLSPFNWSMIAPLVFVGLSMLDALDWRFFMQQVIVNARCVYVHG-- 149 Q9LVK9 ALA7_ARATH
41 YCNPNPFA-----LQNVYGVVYSTTYTAANFSLFQFNVANFYFLTAIISVFE-PLSPFNWSMIAPLVFVGLSMLDALDWRFFMQQVIVNARCVYVHG-- 145 Q9LK90 ALA8_ARATH
45 YCNPFSPFA-----SRNYCQNVYSTYTLATFLSLFQFNVANFYFLTGIVLFT-PLAPYTAASAIPLFVILATMFGVGDWRRKQQLIVNNRVVYVHG-- 149 Q9SX33 ALA9_ARATH
52 -----RGGCAOLANLITTYTLLSFLPNLQFRRFANFYFLTGIVLFT-PLAPYTAASAIPLFVILATMFGVGDWRRKQQLIVNNRVVYVHG-- 151 Q60312 AT10A_HUMAN
49 FPNNSIFD-----WGVSRRYPGNCTITTYLTFPLPNLQFRRFANFYFLTGIVLFT-PLAPYTAASAIPLFVILATMFGVGDWRRKQQLIVNNRVVYVHG-- 158 Q94823 AT10B_HUMAN
54 VFTQPTD-----YEFSGAIVNNITITTYLTFPLPNLQFRRFANFYFLTGIVLFT-PLAPYTAASAIPLFVILATMFGVGDWRRKQQLIVNNRVVYVHG-- 163 Q9P241 AT10D_HUMAN
27 YVGRPPPG-----AYIYPCYFNVIVSSYTFWNFIPNLQFRRFANFYFLTGIVLFT-PLAPYTAASAIPLFVILATMFGVGDWRRKQQLIVNNRVVYVHG-- 135 P98196 AT11A_HUMAN
23 YVGRPPPG-----NGLYTPQFNIISSTYTFWNFIPNLQFRRFANFYFLTGIVLFT-PLAPYTAASAIPLFVILATMFGVGDWRRKQQLIVNNRVVYVHG-- 129 Q9V263 AT11B_HUMAN
26 FVGNFVFS-----TAYIAQFCNVIVSSYTFWNFIPNLQFRRFANFYFLTGIVLFT-PLAPYTAASAIPLFVILATMFGVGDWRRKQQLIVNNRVVYVHG-- 133 Q9NB49 AT11C_HUMAN
40 FINQP-----QLTFCNNVSTAYNIITFLFLYSQFRAANSFFLEIALQQIPVSPITGYITLIVLLGLTAAALHISIKRHKANAVNKKQTQVLN-- 140 Q29449 AT8A1_BOVIN
56 -----MGGCICLANLITTYTLLSFLPNLQFRRFANFYFLTGIVLFT-PLAPYTAASAIPLFVILATMFGVGDWRRKQQLIVNNRVVYVHG-- 155 Q54827 AT10A_MOUSE
54 IFLOCFD-----YEFSGAIVNNITITTYLTFPLPNLQFRRFANFYFLTGIVLFT-PLAPYTAASAIPLFVILATMFGVGDWRRKQQLIVNNRVVYVHG-- 163 Q8K2X1 AT10D_MOUSE
27 YVGRPPPG-----AYIYPCYFNVIVSSYTFWNFIPNLQFRRFANFYFLTGIVLFT-PLAPYTAASAIPLFVILATMFGVGDWRRKQQLIVNNRVVYVHG-- 135 P98197 AT11A_MOUSE
15 YIANFPQ-----NGLYTPQFNIISSTYTFWNFIPNLQFRRFANFYFLTGIVLFT-PLAPYTAASAIPLFVILATMFGVGDWRRKQQLIVNNRVVYVHG-- 121 Q9N024 AT11B_RABIT
23 FVGNFVFS-----TAYIAQFCNVIVSSYTFWNFIPNLQFRRFANFYFLTGIVLFT-PLAPYTAASAIPLFVILATMFGVGDWRRKQQLIVNNRVVYVHG-- 130 Q9QZWO AT11C_MOUSE
40 FINQP-----QLTFCNNVSTAYNIITFLFLYSQFRAANSFFLEIALQQIPVSPITGYITLIVLLGLTAAALHISIKRHKANAVNKKQTQVLN-- 140 Q9V260 AT8A1_HUMAN
40 FINQP-----QLTFCNNVSTAYNIITFLFLYSQFRAANSFFLEIALQQIPVSPITGYITLIVLLGLTAAALHISIKRHKANAVNKKQTQVLN-- 140 P70704 AT8A1_MOUSE
19 YLNGS-----LNNFNNQISTAYSVITFLFLYSQFRAANSFFLEIALQQIPVSPITGYITLIVLLGLTAAALHISIKRHKANAVNKKQTQVLN-- 119 Q9N112 AT8A2_HUMAN
67 YANVYFOPFMTFLCISYVANNITTYTNTFTFLPNLQFRRFANFYFLTGIVLFT-PLAPYTAASAIPLFVILATMFGVGDWRRKQQLIVNNRVVYVHG-- 119 P98200 AT8A2_MOUSE
19 YLNGS-----LNNFNNQISTAYSVITFLFLYSQFRAANSFFLEIALQQIPVSPITGYITLIVLLGLTAAALHISIKRHKANAVNKKQTQVLN-- 119 Q9N112 AT8A2_HUMAN
67 YANVYFOPFMTFLCISYVANNITTYTNTFTFLPNLQFRRFANFYFLTGIVLFT-PLAPYTAASAIPLFVILATMFGVGDWRRKQQLIVNNRVVYVHG-- 119 P98200 AT8A2_MOUSE
19 YLNGS-----LNNFNNQISTAYSVITFLFLYSQFRAANSFFLEIALQQIPVSPITGYITLIVLLGLTAAALHISIKRHKANAVNKKQTQVLN-- 119 Q9N112 AT8A2_HUMAN
67 YANVYFOPFMTFLCISYVANNITTYTNTFTFLPNLQFRRFANFYFLTGIVLFT-PLAPYTAASAIPLFVILATMFGVGDWRRKQQLIVNNRVVYVHG-- 119 P98200 AT8A2_MOUSE
36 YANVYFOPFMTFLCISYVANNITTYTNTFTFLPNLQFRRFANFYFLTGIVLFT-PLAPYTAASAIPLFVILATMFGVGDWRRKQQLIVNNRVVYVHG-- 119 P98200 AT8A2_MOUSE
36 YANVYFOPFMTFLCISYVANNITTYTNTFTFLPNLQFRRFANFYFLTGIVLFT-PLAPYTAASAIPLFVILATMFGVGDWRRKQQLIVNNRVVYVHG-- 119 P98200 AT8A2_MOUSE
36 YANVYFOPFMTFLCISYVANNITTYTNTFTFLPNLQFRRFANFYFLTGIVLFT-PLAPYTAASAIPLFVILATMFGVGDWRRKQQLIVNNRVVYVHG-- 119 P98200 AT8A2_MOUSE
110 QANNAYNGO-----FKEVILWLCQKRYVNNITTYTNTFTFLPNLQFRRFANFYFLTGIVLFT-PLAPYTAASAIPLFVILATMFGVGDWRRKQQLIVNNRVVYVHG-- 224 Q60423 AT8B3_HUMAN
16 YANVYFOPFMTFLCISYVANNITTYTNTFTFLPNLQFRRFANFYFLTGIVLFT-PLAPYTAASAIPLFVILATMFGVGDWRRKQQLIVNNRVVYVHG-- 119 P98200 AT8A2_MOUSE
40 QANNVFNLS-----FYPNNSITTYTNTFTFLPNLQFRRFANFYFLTGIVLFT-PLAPYTAASAIPLFVILATMFGVGDWRRKQQLIVNNRVVYVHG-- 143 A3FIN4 AT8B5_MOUSE
186 YINSLAN-----SSFGYSNITITTYTNTFTFLPNLQFRRFANFYFLTGIVLFT-PLAPYTAASAIPLFVILATMFGVGDWRRKQQLIVNNRVVYVHG-- 290 P39524 ATC3_YEAST
209 YNNLPLPDM-----EGGLPLAVYFNNITTYTNTFTFLPNLQFRRFANFYFLTGIVLFT-PLAPYTAASAIPLFVILATMFGVGDWRRKQQLIVNNRVVYVHG-- 323 Q12675 ATC4_YEAST
171 YNNLPLPDM-----EGGLPIMQYFNNITTYTNTFTFLPNLQFRRFANFYFLTGIVLFT-PLAPYTAASAIPLFVILATMFGVGDWRRKQQLIVNNRVVYVHG-- 325 Q12675 ATC5_YEAST
160 YNNLPLPDM-----EGGLPIMQYFNNITTYTNTFTFLPNLQFRRFANFYFLTGIVLFT-PLAPYTAASAIPLFVILATMFGVGDWRRKQQLIVNNRVVYVHG-- 325 Q12675 ATC5_YEAST
117 YNNLPLPDM-----EGGLPIMQYFNNITTYTNTFTFLPNLQFRRFANFYFLTGIVLFT-PLAPYTAASAIPLFVILATMFGVGDWRRKQQLIVNNRVVYVHG-- 325 Q12675 ATC5_YEAST
42 YNNLPLPDM-----EGGLPIMQYFNNITTYTNTFTFLPNLQFRRFANFYFLTGIVLFT-PLAPYTAASAIPLFVILATMFGVGDWRRKQQLIVNNRVVYVHG-- 325 Q12675 ATC5_YEAST
42 YNNLPLPDM-----EGGLPIMQYFNNITTYTNTFTFLPNLQFRRFANFYFLTGIVLFT-PLAPYTAASAIPLFVILATMFGVGDWRRKQQLIVNNRVVYVHG-- 325 Q12675 ATC5_YEAST
120 YNNLPLPDM-----EGGLPIMQYFNNITTYTNTFTFLPNLQFRRFANFYFLTGIVLFT-PLAPYTAASAIPLFVILATMFGVGDWRRKQQLIVNNRVVYVHG-- 325 Q12675 ATC5_YEAST
120 YNNLPLPDM-----EGGLPIMQYFNNITTYTNTFTFLPNLQFRRFANFYFLTGIVLFT-PLAPYTAASAIPLFVILATMFGVGDWRRKQQLIVNNRVVYVHG-- 325 Q12675 ATC5_YEAST
119 YNNLPLPDM-----EGGLPIMQYFNNITTYTNTFTFLPNLQFRRFANFYFLTGIVLFT-PLAPYTAASAIPLFVILATMFGVGDWRRKQQLIVNNRVVYVHG-- 325 Q12675 ATC5_YEAST
118 YNNLPLPDM-----EGGLPIMQYFNNITTYTNTFTFLPNLQFRRFANFYFLTGIVLFT-PLAPYTAASAIPLFVILATMFGVGDWRRKQQLIVNNRVVYVHG-- 325 Q12675 ATC5_YEAST
119 YNNLPLPDM-----EGGLPIMQYFNNITTYTNTFTFLPNLQFRRFANFYFLTGIVLFT-PLAPYTAASAIPLFVILATMFGVGDWRRKQQLIVNNRVVYVHG-- 325 Q12675 ATC5_YEAST

148 -----NGIFRQEW 156 Q9LI83 ALA10_ARATH
146 -----NGIFRQEW 154 Q9SAF5 ALA11_ARATH
150 -----NGIFRQEW 152 P57792 ALA12_ARATH
176 -----GQFRRKQ 183 P98204 ALA1_ARATH
109 -----GQFRRKQ 116 P98205 ALA2_ARATH
141 -----GQFRRKQ 149 Q9XIE6 ALA3_ARATH
149 -----GQFRRKQ 157 Q9LQ4 ALA4_ARATH
149 -----GQFRRKQ 157 Q9SGG3 ALA5_ARATH
150 -----GQFRRKQ 158 Q9SLK6 ALA6_ARATH
149 -----GQFRRKQ 157 Q9LVK9 ALA7_ARATH
146 -----GQFRRKQ 154 Q9LK90 ALA8_ARATH
150 -----GQFRRKQ 158 Q9SX33 ALA9_ARATH
152 -----GQFRRKQ 160 Q60312 AT10A_HUMAN
159 -----GQFRRKQ 167 Q94823 AT10B_HUMAN
164 -----GQFRRKQ 172 Q9P241 AT10D_HUMAN
136 -----GQFRRKQ 143 P98196 AT11A_HUMAN
130 -----GQFRRKQ 137 Q9V263 AT11B_HUMAN
134 -----GQFRRKQ 141 Q9NB49 AT11C_HUMAN
141 -----GQFRRKQ 148 Q29449 AT8A1_BOVIN
156 -----GQFRRKQ 164 Q54827 AT10A_MOUSE
164 -----GQFRRKQ 172 Q8K2X1 AT10D_MOUSE
136 -----GQFRRKQ 143 P98197 AT11A_MOUSE
122 -----GQFRRKQ 129 Q9N024 AT11B_RABIT
131 -----GQFRRKQ 138 Q9QZWO AT11C_MOUSE
141 -----GQFRRKQ 148 Q9V260 AT8A1_HUMAN
120 -----GQFRRKQ 127 Q9N112 AT8A2_HUMAN
184 -----GQFRRKQ 191 Q43520 AT8B1_HUMAN
140 -----GQFRRKQ 147 P98198 AT8B2_HUMAN
140 -----GQFRRKQ 147 P98199 AT8B2_MOUSE
225 -----GQFRRKQ 232 Q60423 AT8B3_HUMAN
120 -----GQFRRKQ 127 Q8TF62 AT8B4_HUMAN
144 -----GQFRRKQ 151 A3FIN4 AT8B5_MOUSE
291 -----GQFRRKQ 298 P39524 ATC3_YEAST
262 -----GQFRRKQ 267 Q12675 ATC4_YEAST
233 -----GQFRRKQ 229 Q12675 ATC5_YEAST
145 -----GQFRRKQ 152 Q12675 ATC6_YEAST
145 -----GQFRRKQ 152 Q12675 ATC7_YEAST
223 -----GQFRRKQ 230 Q12675 ATC8_YEAST
222 -----GQFRRKQ 229 Q12675 ATC9_YEAST
221 -----GQFRRKQ 228 Q12675 ATC10_YEAST
222 -----GQFRRKQ 229 Q12675 ATC11_YEAST

157 NLLVGVIVVVEFFPALLLLSSSYGVVYTMNLGNTNLVQGLATSSLLN 270 Q9LI83 ALA10_ARATH
158 NLLVGVIVVVEFFPALLLLSSSYGVVYTMNLGNTNLVQGLATSSLLN 268 Q9SAF5 ALA11_ARATH
159 NLLVGVIVVVEFFPALLLLSSSYGVVYTMNLGNTNLVQGLATSSLLN 271 F57792 ALA12_ARATH
160 NLLVGVIVVVEFFPALLLLSSSYGVVYTMNLGNTNLVQGLATSSLLN 294 F98204 ALA1_ARATH
161 NLLVGVIVVVEFFPALLLLSSSYGVVYTMNLGNTNLVQGLATSSLLN 233 F98205 ALA2_ARATH
162 NLLVGVIVVVEFFPALLLLSSSYGVVYTMNLGNTNLVQGLATSSLLN 262 Q9XIE6 ALA3_ARATH
163 NLLVGVIVVVEFFPALLLLSSSYGVVYTMNLGNTNLVQGLATSSLLN 270 Q9LNQ4 ALA4_ARATH
164 NLLVGVIVVVEFFPALLLLSSSYGVVYTMNLGNTNLVQGLATSSLLN 270 Q9SGG3 ALA5_ARATH
165 NLLVGVIVVVEFFPALLLLSSSYGVVYTMNLGNTNLVQGLATSSLLN 271 Q9SLK6 ALA6_ARATH
166 NLLVGVIVVVEFFPALLLLSSSYGVVYTMNLGNTNLVQGLATSSLLN 270 Q9LVK9 ALA7_ARATH
167 NLLVGVIVVVEFFPALLLLSSSYGVVYTMNLGNTNLVQGLATSSLLN 264 Q9LK90 ALA8_ARATH
168 NLLVGVIVVVEFFPALLLLSSSYGVVYTMNLGNTNLVQGLATSSLLN 271 Q9SX33 ALA9_ARATH
169 NLLVGVIVVVEFFPALLLLSSSYGVVYTMNLGNTNLVQGLATSSLLN 274 Q60312 AT10A_HUMAN
170 NLLVGVIVVVEFFPALLLLSSSYGVVYTMNLGNTNLVQGLATSSLLN 281 Q94823 AT10B_HUMAN
171 NLLVGVIVVVEFFPALLLLSSSYGVVYTMNLGNTNLVQGLATSSLLN 286 Q9P241 AT10D_HUMAN
172 NLLVGVIVVVEFFPALLLLSSSYGVVYTMNLGNTNLVQGLATSSLLN 261 F98196 AT11A_HUMAN
173 NLLVGVIVVVEFFPALLLLSSSYGVVYTMNLGNTNLVQGLATSSLLN 254 Q9Y263 AT11B_HUMAN
174 NLLVGVIVVVEFFPALLLLSSSYGVVYTMNLGNTNLVQGLATSSLLN 259 Q9B849 AT11C_HUMAN
175 NLLVGVIVVVEFFPALLLLSSSYGVVYTMNLGNTNLVQGLATSSLLN 262 Q29449 AT8A1_BOVIN
176 NLLVGVIVVVEFFPALLLLSSSYGVVYTMNLGNTNLVQGLATSSLLN 278 Q54827 AT10A_MOUSE
177 NLLVGVIVVVEFFPALLLLSSSYGVVYTMNLGNTNLVQGLATSSLLN 286 Q8K2X1 AT10D_MOUSE
178 NLLVGVIVVVEFFPALLLLSSSYGVVYTMNLGNTNLVQGLATSSLLN 261 F98197 AT11A_MOUSE
179 NLLVGVIVVVEFFPALLLLSSSYGVVYTMNLGNTNLVQGLATSSLLN 246 Q9M024 AT11B_RABIT
180 NLLVGVIVVVEFFPALLLLSSSYGVVYTMNLGNTNLVQGLATSSLLN 256 Q9QZM0 AT11C_MOUSE
181 NLLVGVIVVVEFFPALLLLSSSYGVVYTMNLGNTNLVQGLATSSLLN 262 Q9Y2Q0 AT8A1_HUMAN
182 NLLVGVIVVVEFFPALLLLSSSYGVVYTMNLGNTNLVQGLATSSLLN 262 F70704 AT8A1_MOUSE
183 NLLVGVIVVVEFFPALLLLSSSYGVVYTMNLGNTNLVQGLATSSLLN 241 Q9M112 AT8A2_HUMAN
184 NLLVGVIVVVEFFPALLLLSSSYGVVYTMNLGNTNLVQGLATSSLLN 241 F98200 AT8A2_MOUSE
185 NLLVGVIVVVEFFPALLLLSSSYGVVYTMNLGNTNLVQGLATSSLLN 305 Q43520 AT8B1_HUMAN
186 NLLVGVIVVVEFFPALLLLSSSYGVVYTMNLGNTNLVQGLATSSLLN 305 Q14W80 AT8B1_MOUSE
187 NLLVGVIVVVEFFPALLLLSSSYGVVYTMNLGNTNLVQGLATSSLLN 260 F98198 AT8B2_HUMAN
188 NLLVGVIVVVEFFPALLLLSSSYGVVYTMNLGNTNLVQGLATSSLLN 260 F98199 AT8B2_MOUSE
189 NLLVGVIVVVEFFPALLLLSSSYGVVYTMNLGNTNLVQGLATSSLLN 346 Q60423 AT8B3_HUMAN
190 NLLVGVIVVVEFFPALLLLSSSYGVVYTMNLGNTNLVQGLATSSLLN 241 Q8TF62 AT8B4_HUMAN
191 NLLVGVIVVVEFFPALLLLSSSYGVVYTMNLGNTNLVQGLATSSLLN 265 A3F1N4 AT8B5_MOUSE
192 NLLVGVIVVVEFFPALLLLSSSYGVVYTMNLGNTNLVQGLATSSLLN 412 Q38249 AT8A1_BOVIN
193 NLLVGVIVVVEFFPALLLLSSSYGVVYTMNLGNTNLVQGLATSSLLN 562 Q12675 ATC4_YEAST
194 NLLVGVIVVVEFFPALLLLSSSYGVVYTMNLGNTNLVQGLATSSLLN 517 F32660 ATC5_YEAST
195 NLLVGVIVVVEFFPALLLLSSSYGVVYTMNLGNTNLVQGLATSSLLN 379 Q40527 ATC7_YEAST
196 NLLVGVIVVVEFFPALLLLSSSYGVVYTMNLGNTNLVQGLATSSLLN 419 Q12674 ATC8_YEAST
197 NLLVGVIVVVEFFPALLLLSSSYGVVYTMNLGNTNLVQGLATSSLLN 268 Q75110 ATP9A_HUMAN
198 NLLVGVIVVVEFFPALLLLSSSYGVVYTMNLGNTNLVQGLATSSLLN 268 Q70228 ATP9A_MOUSE
199 NLLVGVIVVVEFFPALLLLSSSYGVVYTMNLGNTNLVQGLATSSLLN 346 A1A476 ATP9B_BOVIN
200 NLLVGVIVVVEFFPALLLLSSSYGVVYTMNLGNTNLVQGLATSSLLN 345 Q43861 ATP9B_HUMAN
201 NLLVGVIVVVEFFPALLLLSSSYGVVYTMNLGNTNLVQGLATSSLLN 344 F98195 ATP9B_MOUSE
202 NLLVGVIVVVEFFPALLLLSSSYGVVYTMNLGNTNLVQGLATSSLLN 345 D4AB88 ATP9B_RAT

271 VYGVAVFTIGTIVQNSTPSPSSSMIEKMDIYILMFLVFLMSFVGSIFVGI 384 Q9LI83 ALA10_ARATH
272 VYGVAVFTIGTIVQNSTPSPSSSMIEKMDIYILMFLVFLMSFVGSIFVGI 383 Q9SAF5 ALA11_ARATH
273 VYGVAVFTIGTIVQNSTPSPSSSMIEKMDIYILMFLVFLMSFVGSIFVGI 384 F57792 ALA12_ARATH
274 VYGVAVFTIGTIVQNSTPSPSSSMIEKMDIYILMFLVFLMSFVGSIFVGI 341 F98204 ALA1_ARATH
275 VYGVAVFTIGTIVQNSTPSPSSSMIEKMDIYILMFLVFLMSFVGSIFVGI 335 F98205 ALA2_ARATH
276 VYGVAVFTIGTIVQNSTPSPSSSMIEKMDIYILMFLVFLMSFVGSIFVGI 366 Q9XIE6 ALA3_ARATH
277 VYGVAVFTIGTIVQNSTPSPSSSMIEKMDIYILMFLVFLMSFVGSIFVGI 379 Q9LNQ4 ALA4_ARATH
278 VYGVAVFTIGTIVQNSTPSPSSSMIEKMDIYILMFLVFLMSFVGSIFVGI 379 Q9SGG3 ALA5_ARATH
279 VYGVAVFTIGTIVQNSTPSPSSSMIEKMDIYILMFLVFLMSFVGSIFVGI 390 Q9SLK6 ALA6_ARATH
280 VYGVAVFTIGTIVQNSTPSPSSSMIEKMDIYILMFLVFLMSFVGSIFVGI 379 Q9LVK9 ALA7_ARATH
281 VYGVAVFTIGTIVQNSTPSPSSSMIEKMDIYILMFLVFLMSFVGSIFVGI 378 Q9LK90 ALA8_ARATH
282 VYGVAVFTIGTIVQNSTPSPSSSMIEKMDIYILMFLVFLMSFVGSIFVGI 384 Q9SX33 ALA9_ARATH
283 VYGVAVFTIGTIVQNSTPSPSSSMIEKMDIYILMFLVFLMSFVGSIFVGI 381 Q60312 AT10A_HUMAN
284 VYGVAVFTIGTIVQNSTPSPSSSMIEKMDIYILMFLVFLMSFVGSIFVGI 387 Q40823 AT10B_HUMAN
285 VYGVAVFTIGTIVQNSTPSPSSSMIEKMDIYILMFLVFLMSFVGSIFVGI 392 Q9P241 AT10D_HUMAN
286 VYGVAVFTIGTIVQNSTPSPSSSMIEKMDIYILMFLVFLMSFVGSIFVGI 368 F98196 AT11A_HUMAN
287 VYGVAVFTIGTIVQNSTPSPSSSMIEKMDIYILMFLVFLMSFVGSIFVGI 361 Q9Y263 AT11B_HUMAN
288 VYGVAVFTIGTIVQNSTPSPSSSMIEKMDIYILMFLVFLMSFVGSIFVGI 366 Q9B849 AT11C_HUMAN
289 VYGVAVFTIGTIVQNSTPSPSSSMIEKMDIYILMFLVFLMSFVGSIFVGI 363 Q29449 AT8A1_BOVIN
290 VYGVAVFTIGTIVQNSTPSPSSSMIEKMDIYILMFLVFLMSFVGSIFVGI 385 Q54827 AT10A_MOUSE
291 VYGVAVFTIGTIVQNSTPSPSSSMIEKMDIYILMFLVFLMSFVGSIFVGI 392 Q8K2X1 AT10D_MOUSE
292 VYGVAVFTIGTIVQNSTPSPSSSMIEKMDIYILMFLVFLMSFVGSIFVGI 368 F98197 AT11A_MOUSE
293 VYGVAVFTIGTIVQNSTPSPSSSMIEKMDIYILMFLVFLMSFVGSIFVGI 353 Q9M024 AT11B_RABIT
294 VYGVAVFTIGTIVQNSTPSPSSSMIEKMDIYILMFLVFLMSFVGSIFVGI 363 Q9QZM0 AT11C_MOUSE
295 VYGVAVFTIGTIVQNSTPSPSSSMIEKMDIYILMFLVFLMSFVGSIFVGI 363 Q9Y2Q0 AT8A1_HUMAN
296 VYGVAVFTIGTIVQNSTPSPSSSMIEKMDIYILMFLVFLMSFVGSIFVGI 363 F70704 AT8A1_MOUSE
297 VYGVAVFTIGTIVQNSTPSPSSSMIEKMDIYILMFLVFLMSFVGSIFVGI 342 Q9M112 AT8A2_HUMAN
298 VYGVAVFTIGTIVQNSTPSPSSSMIEKMDIYILMFLVFLMSFVGSIFVGI 342 F98200 AT8A2_MOUSE
299 VYGVAVFTIGTIVQNSTPSPSSSMIEKMDIYILMFLVFLMSFVGSIFVGI 408 Q43520 AT8B1_HUMAN
300 VYGVAVFTIGTIVQNSTPSPSSSMIEKMDIYILMFLVFLMSFVGSIFVGI 408 Q14W80 AT8B1_MOUSE
301 VYGVAVFTIGTIVQNSTPSPSSSMIEKMDIYILMFLVFLMSFVGSIFVGI 365 F98198 AT8B2_HUMAN
302 VYGVAVFTIGTIVQNSTPSPSSSMIEKMDIYILMFLVFLMSFVGSIFVGI 365 F98199 AT8B2_MOUSE
303 VYGVAVFTIGTIVQNSTPSPSSSMIEKMDIYILMFLVFLMSFVGSIFVGI 449 Q60423 AT8B3_HUMAN
304 VYGVAVFTIGTIVQNSTPSPSSSMIEKMDIYILMFLVFLMSFVGSIFVGI 346 Q8TF62 AT8B4_HUMAN
305 VYGVAVFTIGTIVQNSTPSPSSSMIEKMDIYILMFLVFLMSFVGSIFVGI 370 A3F1N4 AT8B5_MOUSE
306 VYGVAVFTIGTIVQNSTPSPSSSMIEKMDIYILMFLVFLMSFVGSIFVGI 514 Q38249 AT8A1_BOVIN
307 VYGVAVFTIGTIVQNSTPSPSSSMIEKMDIYILMFLVFLMSFVGSIFVGI 666 Q12675 ATC4_YEAST
308 VYGVAVFTIGTIVQNSTPSPSSSMIEKMDIYILMFLVFLMSFVGSIFVGI 621 F32660 ATC5_YEAST
309 VYGVAVFTIGTIVQNSTPSPSSSMIEKMDIYILMFLVFLMSFVGSIFVGI 463 Q40527 ATC7_YEAST
310 VYGVAVFTIGTIVQNSTPSPSSSMIEKMDIYILMFLVFLMSFVGSIFVGI 520 Q12674 ATC8_YEAST
311 VYGVAVFTIGTIVQNSTPSPSSSMIEKMDIYILMFLVFLMSFVGSIFVGI 351 Q75110 ATP9A_HUMAN
312 VYGVAVFTIGTIVQNSTPSPSSSMIEKMDIYILMFLVFLMSFVGSIFVGI 351 Q70228 ATP9A_MOUSE
313 VYGVAVFTIGTIVQNSTPSPSSSMIEKMDIYILMFLVFLMSFVGSIFVGI 429 A1A476 ATP9B_BOVIN
314 VYGVAVFTIGTIVQNSTPSPSSSMIEKMDIYILMFLVFLMSFVGSIFVGI 428 Q43861 ATP9B_HUMAN
315 VYGVAVFTIGTIVQNSTPSPSSSMIEKMDIYILMFLVFLMSFVGSIFVGI 427 F98195 ATP9B_MOUSE
316 VYGVAVFTIGTIVQNSTPSPSSSMIEKMDIYILMFLVFLMSFVGSIFVGI 428 D4AB88 ATP9B_RAT

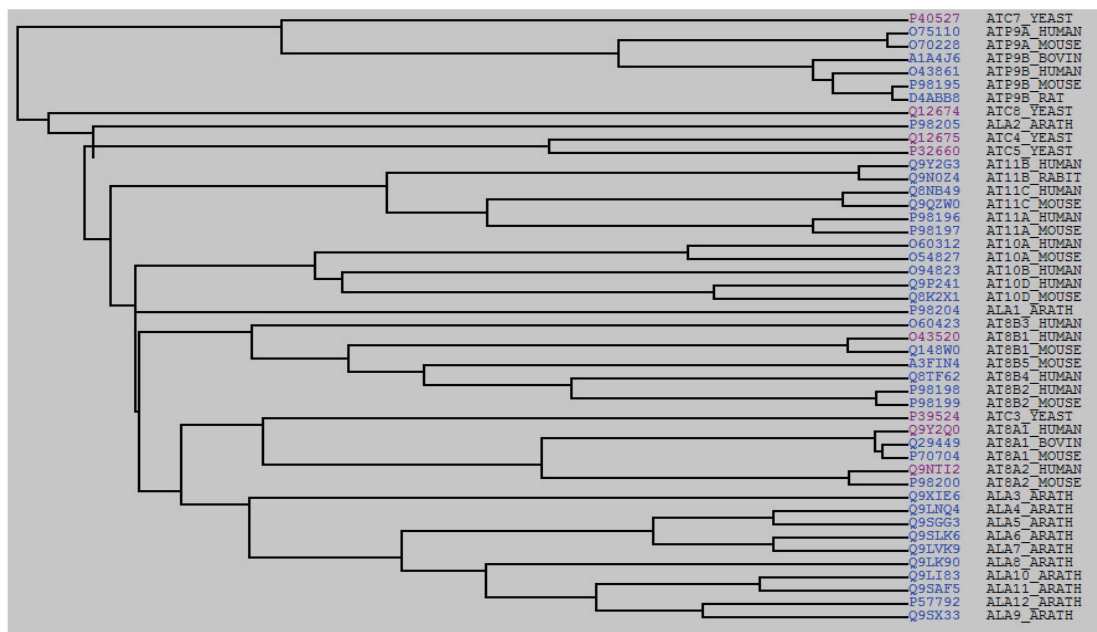
814 T YALDEIEMFLLAISCAVVICSSPFCALVTLVSGTGTTLAIGGANVGM 873 Q9LI83 ALA10_ARATH
815 T YALDEIEMFLLAISCAVVICSSPFCALVTLVSGTGTTLAIGGANVGM 874 Q9SAF5 ALA11_ARATH
816 T YALDEIEMFLLAISCAVVICSSPFCALVTLVSGTGTTLAIGGANVGM 875 Q9LIQ4 ALA12_ARATH
817 T YALDEIEMFLLAISCAVVICSSPFCALVTLVSGTGTTLAIGGANVGM 876 P98204 ALA1_ARATH
818 T YALDEIEMFLLAISCAVVICSSPFCALVTLVSGTGTTLAIGGANVGM 877 P98205 ALA2_ARATH
819 T YALDEIEMFLLAISCAVVICSSPFCALVTLVSGTGTTLAIGGANVGM 878 Q9XIE6 ALA3_ARATH
820 T YALDEIEMFLLAISCAVVICSSPFCALVTLVSGTGTTLAIGGANVGM 879 Q9LIQ4 ALA4_ARATH
821 T YALDEIEMFLLAISCAVVICSSPFCALVTLVSGTGTTLAIGGANVGM 880 Q9SG63 ALA5_ARATH
822 T YALDEIEMFLLAISCAVVICSSPFCALVTLVSGTGTTLAIGGANVGM 881 Q9SLK6 ALA6_ARATH
823 T YALDEIEMFLLAISCAVVICSSPFCALVTLVSGTGTTLAIGGANVGM 882 Q9LVK9 ALA7_ARATH
824 T YALDEIEMFLLAISCAVVICSSPFCALVTLVSGTGTTLAIGGANVGM 883 Q9LK90 ALA8_ARATH
825 T YALDEIEMFLLAISCAVVICSSPFCALVTLVSGTGTTLAIGGANVGM 884 Q9SX33 ALA9_ARATH
826 T YALDEIEMFLLAISCAVVICSSPFCALVTLVSGTGTTLAIGGANVGM 885 Q9Q2W0 AT108_HUMAN
827 T YALDEIEMFLLAISCAVVICSSPFCALVTLVSGTGTTLAIGGANVGM 886 Q942Q0 AT8A1_MOUSE
828 T YALDEIEMFLLAISCAVVICSSPFCALVTLVSGTGTTLAIGGANVGM 887 P97074 AT8A1_MOUSE
829 T YALDEIEMFLLAISCAVVICSSPFCALVTLVSGTGTTLAIGGANVGM 890 Q9NT12 AT8A2_HUMAN
830 T YALDEIEMFLLAISCAVVICSSPFCALVTLVSGTGTTLAIGGANVGM 891 P98200 AT8A2_HUMAN
831 T YALDEIEMFLLAISCAVVICSSPFCALVTLVSGTGTTLAIGGANVGM 901 Q43520 AT8B1_HUMAN
832 T YALDEIEMFLLAISCAVVICSSPFCALVTLVSGTGTTLAIGGANVGM 901 Q148W0 AT8B1_MOUSE
833 T YALDEIEMFLLAISCAVVICSSPFCALVTLVSGTGTTLAIGGANVGM 841 P98198 AT8B2_HUMAN
834 T YALDEIEMFLLAISCAVVICSSPFCALVTLVSGTGTTLAIGGANVGM 841 P98199 AT8B2_MOUSE
835 T YALDEIEMFLLAISCAVVICSSPFCALVTLVSGTGTTLAIGGANVGM 947 Q60423 AT8B3_HUMAN
836 T YALDEIEMFLLAISCAVVICSSPFCALVTLVSGTGTTLAIGGANVGM 823 Q8TF62 AT8B4_HUMAN
837 T YALDEIEMFLLAISCAVVICSSPFCALVTLVSGTGTTLAIGGANVGM 846 A3FTN4 AT8B5_MOUSE
838 T YALDEIEMFLLAISCAVVICSSPFCALVTLVSGTGTTLAIGGANVGM 962 Q93524 ATC3_YEAST
839 T YALDEIEMFLLAISCAVVICSSPFCALVTLVSGTGTTLAIGGANVGM 1181 Q12675 ATC4_YEAST
840 T YALDEIEMFLLAISCAVVICSSPFCALVTLVSGTGTTLAIGGANVGM 1138 P32660 ATC5_YEAST
841 T YALDEIEMFLLAISCAVVICSSPFCALVTLVSGTGTTLAIGGANVGM 890 P40527 ATC7_YEAST
842 T YALDEIEMFLLAISCAVVICSSPFCALVTLVSGTGTTLAIGGANVGM 1237 Q12674 ATC8_YEAST
843 T YALDEIEMFLLAISCAVVICSSPFCALVTLVSGTGTTLAIGGANVGM 793 Q75110 ATP9A_HUMAN
844 T YALDEIEMFLLAISCAVVICSSPFCALVTLVSGTGTTLAIGGANVGM 793 Q70228 ATP9A_MOUSE
845 T YALDEIEMFLLAISCAVVICSSPFCALVTLVSGTGTTLAIGGANVGM 882 A1A4J6 ATP9B_BOVIN
846 T YALDEIEMFLLAISCAVVICSSPFCALVTLVSGTGTTLAIGGANVGM 882 Q43861 ATP9B_HUMAN
847 T YALDEIEMFLLAISCAVVICSSPFCALVTLVSGTGTTLAIGGANVGM 881 P98195 ATP9B_MOUSE
848 T YALDEIEMFLLAISCAVVICSSPFCALVTLVSGTGTTLAIGGANVGM 882 D4AB88 ATP9B_RAT

874 Q9LI83 ALA10_ARATH
875 Q9SAF5 ALA11_ARATH
876 Q9LIQ4 ALA12_ARATH
877 P98204 ALA1_ARATH
878 P98205 ALA2_ARATH
879 Q9XIE6 ALA3_ARATH
880 Q9LIQ4 ALA4_ARATH
881 Q9SG63 ALA5_ARATH
882 Q9SLK6 ALA6_ARATH
883 Q9LVK9 ALA7_ARATH
884 Q9LK90 ALA8_ARATH
885 Q9SX33 ALA9_ARATH
886 Q9Q2W0 AT108_HUMAN
887 Q942Q0 AT8A1_MOUSE
888 P97074 AT8A1_MOUSE
889 Q9NT12 AT8A2_HUMAN
890 P98200 AT8A2_HUMAN
901 Q43520 AT8B1_HUMAN
901 Q148W0 AT8B1_MOUSE
841 P98198 AT8B2_HUMAN
841 P98199 AT8B2_MOUSE
947 Q60423 AT8B3_HUMAN
823 Q8TF62 AT8B4_HUMAN
846 A3FTN4 AT8B5_MOUSE
962 Q93524 ATC3_YEAST
1181 Q12675 ATC4_YEAST
1138 P32660 ATC5_YEAST
890 P40527 ATC7_YEAST
1237 Q12674 ATC8_YEAST
793 Q75110 ATP9A_HUMAN
793 Q70228 ATP9A_MOUSE
882 A1A4J6 ATP9B_BOVIN
882 Q43861 ATP9B_HUMAN
881 P98195 ATP9B_MOUSE
882 D4AB88 ATP9B_RAT

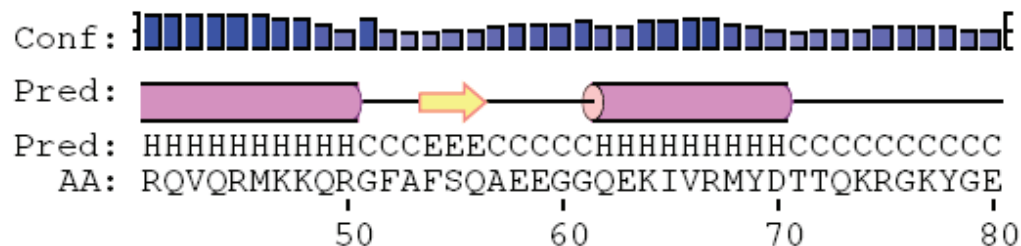
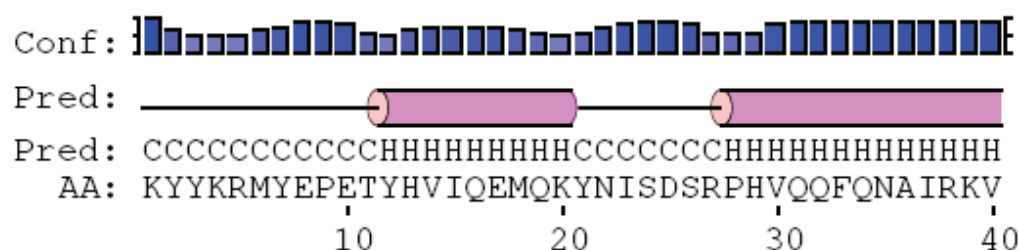
[illegible]

163

Guide tree



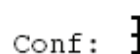
Prédiction de structure du C-terminal de Drs2p :



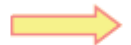
Legend:



= helix



= confidence of prediction



= strand

Pred: predicted secondary structure



= coil

AA: target sequence

Annexe 3

Composition des milieux de culture :

LB (Luria Broth : 1% bacto tryptone ; 0,5% yeast extract ; 1% NaCl). Ajout d'ampicilline pour une concentration finale à 50 µg/mL.

S6A+/-U (0,1% bactocasamino (p/v) ; 0,17% yeast nitrogen base sans acide aminé ni d'ammonium sulfate (p/v) ; 2% de glucose (p/v) ; 20 µg/mL d'Adénine +/- 20 µg/mL d'Uracile).

S5A+/-U (0,1% bactocasamino (p/v) ; 0,17% yeast nitrogen base sans acide aminé ni d'ammonium sulfate (p/v) ; 2% de galactose (p/v) ; 20 µg/mL d'Adénine +/- 20 µg/mL d'Uracile).

SD (0,17% yeast nitrogen base w/o AA/AS (p/v) ; 0,5% (NH₄)₂SO₄ (p/v) ; 55 µg/mL d'Adénine ; 55 µg/mL d'Uracile ; 55 µg/mL de L-Tyrosine ; 1% (v/v) de la solution d'acides aminés stérile (0,2% L-Arginine ; 0,1% L-Histidine ; 0,6% L-Isoleucine ; 0,6% L-Leucine ; 0,4% L-Lysine ; 0,1% L-Méthionine ; 0,6% L-Phénylalanine ; 0,5% L-Thréonine ; 0,4% L-Tryptophane (p/v)) et 2% de glucose (p/v)).

YPGE2X : pour 1 L, 20 g yeast extract; 20 g bactopeptone; 860 ml d'eau dé-ionisée.

Amorces utilisées pour la délétion des endogènes :

Gène à déléter	Amorce sens	Amorce antisens
<i>DRS2</i>	(5') <u>GTA ACG CCA AAT AGA GGT</u> <u>TAG CGC CAA GCA ATA ATT TAC</u> <u>TGG TAG GTT CTT TCA TTC CCT</u> <u>GAC TCC TAG TCT AGA AGC TT</u> (3')	(5') <u>ACT TTT CTT TTT ATC TTA</u> <u>TTT TTA TTT TTG TAT TTT TTG</u> <u>TCT TCT GCT CTT TGT TTC TGT</u> <u>GCC CAC ACA CCT CGA GGG</u> CCC (3')
<i>CDC50</i>	(5') <u>GTC CAT GAC GCA CTG CGA</u> <u>ACA AAG AAT AAT TGA GTA</u> <u>ATC GAA CTT GAA GTT CTA TAG</u> <u>AAC AGC TCC TAG TCT AGA AGC</u> TT (3')	(5') <u>CAA CAA AAC TTG TTT ACT</u> <u>TAT AAA CAC AAA TAC CTA CAG</u> <u>GCA CTA AAG TTT GTT TTT TGG</u> <u>CCT CAC ACA CCT CGA GGG CCC</u> (3')

La partie soulignée correspond à la séquence complémentaire du 5' (amorce sens) ou du 3' UTR (amorce antisens) du gène à déléter. La suite code la séquence LoxP.

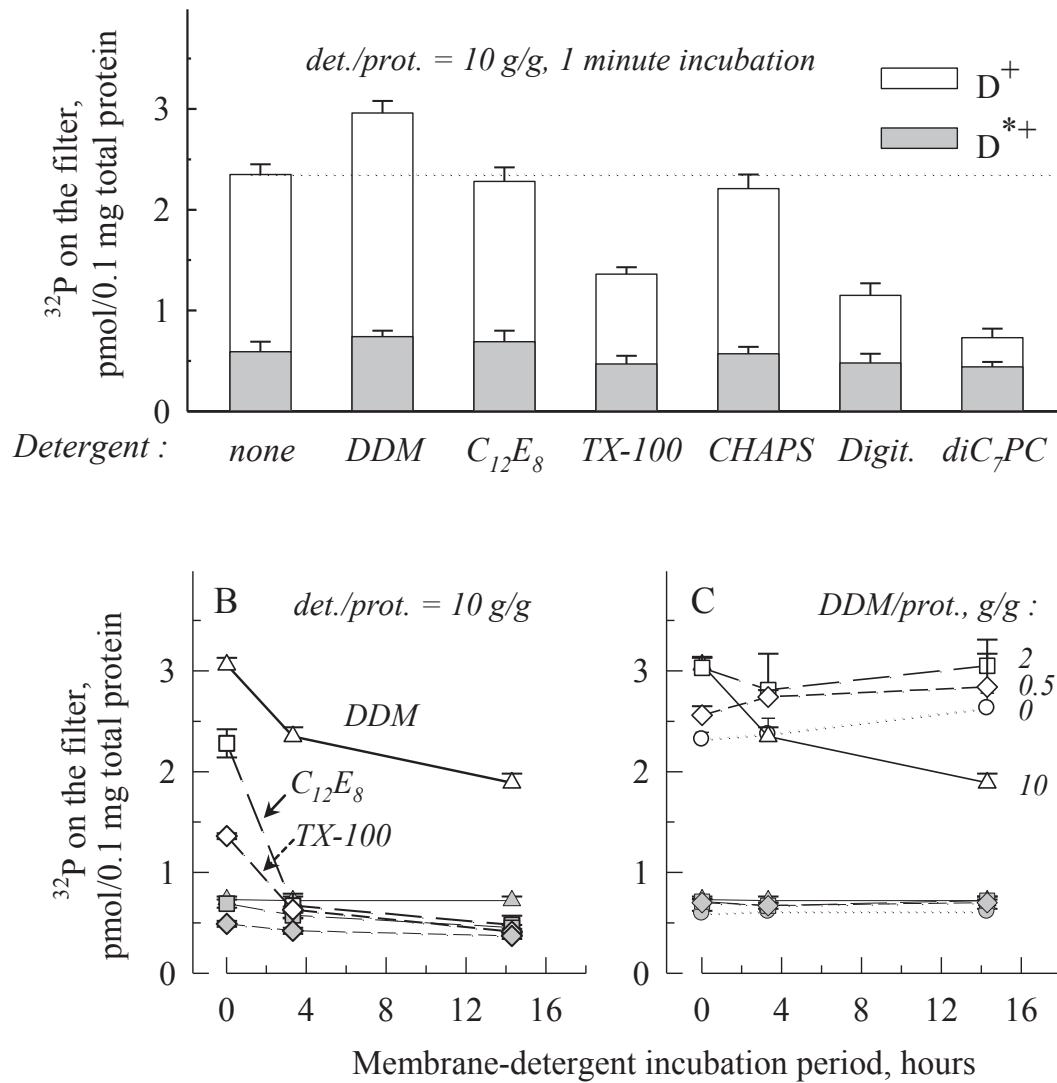
Amorces utilisées pour la vérification de la délétion des endogènes :

Souches	Amplification du 5'du gène d'intérêt	Amplification du 3'du gène d'intérêt	Amplification du 5'du gène HIS3
<i>ΔDRS2 ou W303.1b/GAL4</i>	Amorce sens: (5') GCC ACT AAG TTG AAG AAA CAT (3') et amorce anti-sens: (5') ATT CCT CGA GTC TAG ATA ATT AT (3')	Amorce sens: (5') AGT ATT ATG GTG TGG TTA AAC A (3') et amorce anti-sens: (5') GTG ATG GCT TAA TAT TAT AAC TT (3')	Amorce sens: (5') GCC ACT AAG TTG AAG AAA CAT (3') et amorce anti-sens: (5') AAA GCG ATG GCA ACG CTG A (3')
<i>ΔCDC50 ou W303.1b/GAL4</i>	Amorce sens: (5') TAC TGA AAA TTA GTG TTA CCC G (3') et amorce anti-sens: (5') GTT AAA TTA TAG TCT TCT GTG TC (3')	Amorce sens: (5') CCT ATC AAA AAA GAT GAT CTG G (3') et amorce anti-sens: (5') CAC TTT TAT AGG GAA CAT ATT TT (3')	Amorce sens: (5') TAC TGA AAA TTA GTG TTA CCC G (3') et amorce anti-sens: (5') AAA GCG ATG GCA ACG CTG A (3')

L'amorce sens s'hybride au 5' UTR dans le cas d'une amplification du 5' ou s'hybride au gène d'intérêt dans le cas d'une amplification du 3'. L'amorce antisens s'hybride au gène d'intérêt dans le cas d'une amplification du 5' ou s'hybride au 3' UTR dans le cas d'une amplification du 3'.

NB : Dans la version imprimée de la Figure 7 (voir pages suivantes), il manque la légende des histogrammes du panneau A. Voici la figure complète :

Fig 7: Short and long term effects of detergents on phosphorylation (from $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$) of Drs2p-Bad



Phosphatidylserine Stimulation of Drs2p·Cdc50p Lipid Translocase Dephosphorylation Is Controlled by Phosphatidylinositol-4-phosphate*

Received for publication, October 14, 2011, and in revised form, February 15, 2012. Published, JBC Papers in Press, February 20, 2012, DOI 10.1074/jbc.M111.313916

Aurore Jacquot^{‡§¶}, Cédric Montigny^{‡§}, Hanka Hennrich^{||}, Raphaëlle Barry^{‡§}, Marc le Maire^{‡§¶}, Christine Jaxel^{‡§}, Joost Holthuis^{||}, Philippe Champeil^{‡§}, and Guillaume Lenoir^{‡§¶||}

From the [‡]UMR 8221 (Systèmes Membranaires, Photobiologie, Stress et Détoxication), CNRS and [§]Institut de Biologie et Technologies de Saclay (iBiTec-S), Commissariat à l'Energie Atomique (CEA), F-91191 Gif-sur-Yvette, France, [¶]Université Paris-Sud, F-91405 Orsay, France, and ^{||}Department of Membrane Enzymology, Bijvoet Center and Institute of Biomembranes, Utrecht University, 3584 CH Utrecht, The Netherlands

Background: Transport of phosphatidylserine (PS) analogs by the Drs2p flippase is regulated by PtdIns(4)P.

Results: PS stimulates dephosphorylation of the Drs2p·Cdc50p complex only in the presence of PtdIns(4)P.

Conclusion: The step at which PtdIns(4)P regulates lipid transport is identified.

Significance: Our coordinated overexpression system provides mechanistic insight into PS transport and will be useful for further Drs2p characterization and crystallization.

Here, Drs2p, a yeast lipid translocase that belongs to the family of P₄-type ATPases, was overexpressed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* together with Cdc50p, its glycosylated partner, as a result of the design of a novel co-expression vector. The resulting high yield allowed us, using crude membranes or detergent-solubilized membranes, to measure the formation from [γ -³²P]ATP of a ³²P-labeled transient phosphoenzyme at the catalytic site of Drs2p. Formation of this phosphoenzyme could be detected only if Cdc50p was co-expressed with Drs2p but was not dependent on full glycosylation of Cdc50p. It was inhibited by orthovanadate and fluoride compounds. In crude membranes, the phosphoenzyme formed at steady state at 4 °C displayed ADP-insensitive but temperature-sensitive decay. Solubilizing concentrations of dodecyl maltoside left this decay rate almost unaltered, whereas several other detergents accelerated it. Unexpectedly, the dephosphorylation rate for the solubilized Drs2p·Cdc50p complex was inhibited by the addition of phosphatidylserine. Phosphatidylserine exerted its anticipated accelerating effect on the dephosphorylation of Drs2p·Cdc50p complex only in the additional presence of phosphatidylinositol-4-phosphate. These results explain why phosphatidylinositol-4-phosphate tightly controls Drs2p-catalyzed lipid transport and establish the functional relevance of the Drs2p·Cdc50p complex overexpressed here.

A hallmark of eukaryotic cells is the fact that plasma membranes as well as membranes of the late secretory pathway, including the *trans*-Golgi network (TGN),² display asymmetric

lipid distribution with the aminophospholipids phosphatidylserine (PS) and phosphatidylethanolamine essentially confined in the cytosolic leaflets (1, 2). Maintenance of this asymmetry is critical for many physiological processes as PS externalization is associated, for example, with blood coagulation, macrophage-dependent clearance of apoptotic cells, and virus entry (3–5). The transbilayer distribution of aminophospholipids is largely determined by the presence of ATP-driven lipid translocases or “flippases” (6–8), and converging lines of evidence indicate that members of the P₄ subfamily of P-type ATPases (9), hereafter referred to as P₄-ATPases, constitute such flippases. There are five P₄-ATPases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* among which Drs2p and Dnf3p are located in the TGN (10, 11) and Dnf1p and Dnf2p are located at the plasma membrane (12). Deletion of Dnf1p and Dnf2p inhibits ATP-dependent NBD-PC, -PS, and -phosphatidylethanolamine transport (12), whereas removal of Drs2p abolishes NBD-PS and -phosphatidylethanolamine transport (13, 14). The yeast P₄-ATPase Drs2p, like the mammalian P₄-ATPase ATP8A2, was recently purified and reconstituted into proteoliposomes, demonstrating that these P₄-ATPases are directly involved in the translocation of PS analogs (15–17).

It is also clear now that the association of P₄-ATPases with members of the Cdc50 protein family is of primary importance. Indeed, Cdc50 proteins have been shown to be required for stability and export of P₄-ATPases from the endoplasmic reticulum in yeast and in mammalian cells (14, 18–21) as well as for

* This work was supported by the CNRS and Commissariat à l'Energie Atomique, by a fellowship from the “Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche” (to A. J.), and by a grant from the Agence Nationale pour la Recherche (to C. M., C. J., and M. L. M.).

¹ To whom correspondence should be addressed: iBiTec-S and UMR 8221, CEA Saclay, F-91191 Gif-sur-Yvette, France. Tel.: 33-1-6908-7589; Fax: 33-1-6908-8139; E-mail: guillaume.lenoir@cea.fr.

² The abbreviations used are: TGN, *trans*-Golgi network; P₂- or P₄-ATPase, P-type ATPase of subtype 2 or 4; P2 or P3 membranes, membrane fraction

obtained after intermediate or high speed centrifugation; SERCA1a, sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase, isoform 1a; Bad, biotin acceptor domain; TEV, tobacco etch virus; DDM, *n*-dodecyl β -D-maltoside; C₁₂E₈, octaethylene glycol mono-*n*-dodecyl ether; diC₇PC, 1,2-diheptanoyl-*sn*-phosphatidylcholine; NBD, 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl; PC, phosphatidylcholine; PtdIns(4)P, phosphatidylinositol-4-phosphate; POPC, 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine; POPS, 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoserine; SB, solubilization buffer; NTA, nitrilotriacetic acid; C₁₂E₉, nonaethylene glycol *n*-dodecyl ether; TAP, tandem affinity purification; PS, phosphatidylserine; DOPC, 1,3-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine; DMPS, 1,3-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serine.

PtdIns(4)P Regulation of Drs2p-Cdc50p Turnover

proper functioning of the lipid-pumping complex (20, 22–24). Nevertheless, the molecular mechanism responsible for lipid translocation by P_4 -ATPase-Cdc50 protein complexes remains largely unknown.

Recent studies in yeast have shown that availability of a phosphoinositide, phosphatidylinositol-4-phosphate (PtdIns(4)P), is required for the Drs2p-dependent flip of a fluorescent analog of PS from the exoplasmic to the cytosolic leaflet of the TGN and that a cluster of basic amino acids in the C-terminal region of Drs2p forms a potential binding site for this phosphoinositide (25). In TGN membranes, PtdIns(4)P serves as a platform for the recruitment of effector proteins such as clathrin adaptor or lipid transfer proteins involved in membrane trafficking (for reviews, see Refs. 26 and 27). In addition, Drs2p has been shown to physically interact with the PtdIns(4)P phosphatase Sac1p, a negative regulator of secretory vesicle formation at the TGN (28). Collectively, these data highlight an important regulatory role for PtdIns(4)P in the control of Drs2p activity, but much remains to be elucidated on how this control is exerted.

For deeper characterization of the enzymatic basis for the lipid translocation machinery and because the preparation of sufficient amounts of high quality samples remains a major bottleneck in membrane protein functional and structural characterization, we devised a high yield co-expression system for the yeast P_4 -ATPase Drs2p and its associated subunit Cdc50p. This allowed us to measure the formation from $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ of a transient phosphorylated intermediate during the catalytic cycle of Drs2p without the need for purification of this protein complex. Here we describe inhibitors of the formation of this ^{32}P -labeled phosphoenzyme and characterize its time-dependent decay in crude yeast membranes or in the presence of detergents. Specifically, we reveal the dependence of the dephosphorylation kinetics on the presence of PtdIns(4)P: stimulation of Drs2p dephosphorylation by PS can be achieved only if PtdIns(4)P is present together with PS. Stimulation by PtdIns(4)P of the lipid flippase activity of Drs2p is therefore most probably exerted through acceleration of the fairly slow dephosphorylation step.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials—Products for culture of yeast and bacteria were from Difco (BD Biosciences). Restriction and modification enzymes as well as peptide-*N*-glycosidase F were purchased from New England Biolabs. Phusion® high fidelity polymerase was from Finnzymes. The Clone JET™ PCR cloning kit and the histidine probe (India Hisprobe™-HRP) were from Thermo Fischer Scientific. DDM was from Anatrache, $C_{12}E_8$ was from Nikkol Chemical, Triton X-100 was from Pierce, CHAPS was from Serva, octyl glucoside was from Calbiochem, Tween 20 was from Bio-Rad, digitonin was from Sigma, and Hecameg was a gift from H. Wroblewski and D. Plusquellec (CNRS, Rennes, France). POPC, DOPC, POPS, DMPS, lysophosphatidylcholine, egg lecithin, diC₇PC, and PtdIns(4)P were from Avanti Polar Lipids. $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ was from PerkinElmer Life Sciences (catalog number BLU002A). Chemicals were generally from Sigma (including desferrioxamine B and the avidin-peroxidase probe). Glass fiber A/E filters (1- μm porosity) were from Pall Corp. The EDTA-free protease inhibitor mixture was from

Roche Diagnostics. BSA (albumin fraction V) was from Roth Sochiel. Precision Plus Protein Standards were from Bio-Rad. Rabbit polyclonal antibodies against Tlg2p were obtained as described (29). Mouse monoclonal anti-Dpm1p was from Molecular Probes. Rabbit sarcoplasmic reticulum membranes (30) and yeast-expressed SERCA1a-Bad (31) were prepared as described previously.

Yeast Strains—The *S. cerevisiae* W303.1b/*GAL4* (*a*, *leu2-3*, *his3-11*, *trp1-1::TRP1-GAL10-GAL4*, *ura3-1*, *ade2-1*, *can^r*, *cir⁺*) yeast strain was the same as described previously (32). The Δdrs2 and Δcdc50 deletion mutants were created in a W303.1b/*GAL4* background using a *loxP-HIS3-loxP* cassette as described (12). Plasmid pYeDP60 was generously given by Denis Pompon (Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, Toulouse, France).

Strategy for Coordinated Overexpression of Drs2p and Cdc50p in Yeast and Functionality of Constructs—The *DRS2* open reading frame was supplemented either at its 3'- or 5'-end with a sequence coding for a biotin acceptor domain (Bad) and a sequence coding for a protease cleavage site (thrombin or TEV). The cleavage site was flanked by 2 glycines toward Bad and 4 glycines toward *DRS2*. Similarly, a sequence coding for a decahistidine tag was added at the 3'-end of *CDC50*. The fused genes were cloned independently in pYeDP60 expression plasmids (32–34), resulting in the generation of pYeDP60_*DRS2*-Bad and pYeDP60_*CDC50*-His₁₀ vectors. In these vectors, *DRS2* and *CDC50* are both placed under the control of a strong galactose-inducible *GAL10/CYC1* promoter. Starting from the pYeDP60_*CDC50*-His₁₀ vector, a cassette containing this promoter, the *CDC50* coding sequence, and the *PGK* terminator was then amplified by PCR and subsequently inserted in the pYeDP60_*DRS2*-Bad companion vector, resulting in the plasmid illustrated in Fig. 1. The complementation properties, growth curves, glycosylation properties, and phosphorylation abilities were essentially similar for the constructs bearing either a thrombin or a TEV cleavage site. Unless otherwise noted, the results illustrated in the various figures below were obtained with the thrombin constructs.

Expression of Drs2p-Bad and Cdc50p-His₁₀ in Fernbach Flasks and Yeast Membrane Preparation—Yeast growth and induction of protein expression were performed essentially as described previously (31, 32). Yeast growth took place in a glucose-containing rich growth medium at 28 °C for 36 h, whereas expression of the proteins of interest took place during an additional 18 h in the presence of galactose at 18 °C. Membrane fractionation by differential centrifugation was performed essentially as described previously (31, 32). One modification consisted in using a “Pulverisette 6” planetary mill (Fritsch) for breaking yeast cells with glass beads before fractionation. The crude extract was then submitted to differential centrifugation, resulting in “P2” and “P3” membrane pellets recovered after intermediate and high speed centrifugation, respectively.

Protein Estimation and Immunodetection—Protein concentrations were measured using the bicinchoninic acid procedure (35) in the presence of 2% (w/v) SDS using bovine serum albumin as a standard. For electrophoretic separation and identification, proteins were loaded onto 8% Laemmli polyacrylamide gels and transferred to PVDF membranes using transfer buffer

(30 mM Tris, 200 mM glycine, 10% (v/v) methanol). Detection of the biotinylated Drs2p-Bad was performed using a biotin probe (avidin conjugated to HRP), and detection of Cdc50p-His₁₀ was performed using a His probe conjugated to HRP. When indicated, rabbit anti-Tlg2p was used as a Golgi marker, and mouse anti-Dpmlp was used as an endoplasmic reticulum marker (with goat anti-rabbit horseradish peroxidase- and goat anti-mouse horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies, respectively). Blots were revealed by chemiluminescence with the ECL kit (GE Healthcare).

Solubilization of P3 Membranes with Detergent—D⁺ P3 membranes (*i.e.* P3 membranes obtained after co-expression of wild-type Drs2p-Bad and Cdc50p-His₁₀) were diluted to 2 mg of total protein/ml in ice-cold solubilization buffer (SB) (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 300 mM NaCl, 20% (w/v) glycerol, 5 mM MgCl₂) supplemented with 1 mM PMSF and an EDTA-free protease inhibitor mixture. Detergent was then added to membranes at the desired detergent-to-protein ratio, and the suspension was stirred gently on a wheel for 1 h at 4 °C. Insoluble material was pelleted by centrifugation at 100,000 × *g* for 1 h at 4 °C. The supernatant was withdrawn, and the pellet was resuspended in the same volume of SB as that of the total membrane fraction. Solubilization of Drs2p-Bad and Cdc50p-His₁₀ was analyzed by Western blotting.

Glycosidase Assay—D⁺ P3 membranes were diluted to 2 mg/ml in SB supplemented with 1 mg/ml DDM, 1 mM PMSF, and an EDTA-free protease inhibitor mixture. Samples were incubated for 15 min on ice in the absence or presence of 10 μg/ml peptide-*N*-glycosidase F (*i.e.* 20,000 units/ml) before immunodetection and phosphoenzyme formation from [γ-³²P]ATP.

Phosphorylation from [γ-³²P]ATP—Formation (on ice) of the transient phosphoenzyme intermediate of the Drs2p catalytic cycle was measured after incubation with [γ-³²P]ATP followed by acid quenching and filtration (see *e.g.* Ref. 36). For most experiments, 200-μl samples were preincubated on ice at 0.5 mg of total protein/ml in buffer A (100 mM KCl, 5 mM Mg²⁺, 50 mM Mops-Tris at pH 7) generally supplemented with 100 μM Ca²⁺, various amounts of EGTA, and detergent in the presence or absence of exogenous lipid. In some cases, 1 mM orthovanadate was added. Phosphorylation was triggered by addition of [γ-³²P]ATP (at 0.25–1 mCi/μmol and generally at a final concentration of 0.5 μM) followed by acid quenching (typically 2 ml of 500 mM TCA + 30 mM H₃PO₄). After quenching, samples were left on ice for 15–20 min, a period sufficient for aggregation of the precipitated protein and therefore its retention by the filter (this aggregation period was critical in the presence of detergent). This was followed by filtration on an A/E glass fiber filter (or on two filters on top of each other) and careful rinsing with diluted acid (50 mM TCA + 3 mM H₃PO₄). Note that for yet unknown reasons mere preincubation of crude membranes in phosphorylation buffer before addition of [γ-³²P]ATP allowed their vanadate-dependent phosphorylation level to slowly increase with time (see Fig. 5D, dotted line).

Turnover-dependent Dephosphorylation of Drs2p-Cdc50p—The kinetics of turnover-dependent dephosphorylation were measured by first phosphorylating the sample for 25 s on ice

under the above conditions and then chasing ³²P from the phosphoenzyme by adding excess non-radioactive nucleotide (usually 1 mM Mg²⁺-ATP) and simultaneously changing the temperature to 37 °C (if desired). Two slightly different protocols were used for that purpose.

In the experiments illustrated in Fig. 8, we used a protocol “with dilution” in which the phosphorylated sample (200 μl) was diluted 5-fold into a dephosphorylation medium (800 μl of buffer A supplemented with Ca²⁺ and EGTA) devoid of radioactive ATP but containing non-radioactive nucleotide and pre-equilibrated at 37 °C so that the temperature immediately after mixing was already close to the final temperature (at least 30 °C because of the 5-fold dilution of the initially ice-cold phosphorylation medium). Acid quenching was subsequently performed after various periods by adding concentrated acid (typically 1 ml of acid (1 M TCA + 60 mM H₃PO₄) was added to the 1-ml sample undergoing dephosphorylation).

In the experiments displayed in Fig. 9, we used an ATP chase protocol “without dilution.” The sample was first phosphorylated on ice and then transferred into a tube pre-equilibrated at 37 °C and containing a droplet of concentrated non-radioactive Mg²⁺-ATP for dephosphorylation during the desired time period. Buffer A had been supplemented with 0.1 mM Ca²⁺ and 1 mM EGTA to keep free Ca²⁺ close to “physiological” conditions. We checked that free Ca²⁺ had no effect on the dephosphorylation rate (data not shown).

Removal of Bad and His₁₀ Tags—Removal of the tags from Drs2p-Bad and Cdc50p-His₁₀ was performed by incubating yeast membranes at 2 mg of protein/ml in buffer A supplemented with 100 μM Ca²⁺ for 17 h at 8 °C (with mild stirring on a wheel) in the presence of a sufficient amount of TEV protease. The TEV protease was expressed in *Escherichia coli* and affinity-purified as described (37).

RESULTS

Large Scale Co(over)-expression of Drs2p-Bad and Cdc50p-His₁₀ *Cdc50p Glycosylation, and Vanadate-dependent Phosphorylation of Drs2p-Bad*—We devised a pYedP60_DRS2-Bad/CDC50-His₁₀ plasmid (Fig. 1) appropriate for co-expression with high yield of Drs2p-Bad and Cdc50p-His₁₀. Our various constructs proved functional as deduced (data not shown) from their ability to reverse the cold-sensitive growth phenotype of Δ*drs2* and Δ*cdc50* yeast cells (38). After yeast growth, cells were broken, and “light” (P3) and “heavy” (P2) membrane fractions were prepared by differential centrifugation (31, 32).

The top gel of Fig. 2A compares the Drs2p-Bad contents of the P3 and P2 fractions obtained for wild-type Drs2p co-expressed with Cdc50p (hereafter referred to as “D⁺”) and shows for comparison the results obtained for an inactive Drs2p mutant co-expressed with Cdc50p as well (hereafter referred to as “D⁺”). In D⁺ P3 membranes, comparison with yeast membranes expressing a known amount of SERCA1a-Bad (31) allowed us to estimate that the recombinant Drs2p protein accounted for about 3% of the total protein present in that fraction; this corresponds to about 10 mg of Drs2p/liter of culture (data not shown).

PtdIns(4)P Regulation of Drs2p-Cdc50p Turnover

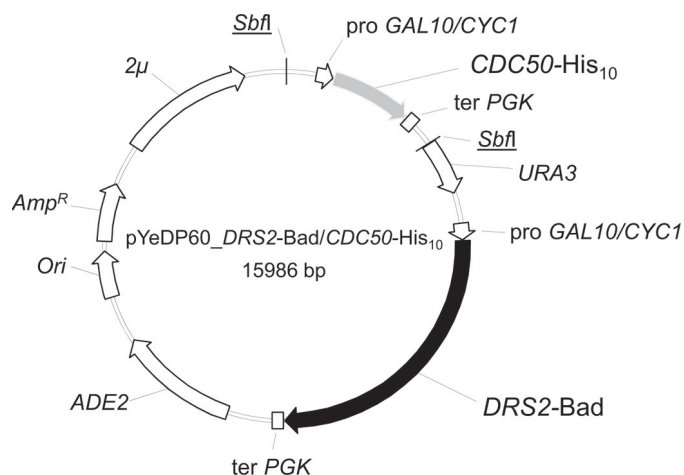


FIGURE 1. Map of plasmid used for co-expression of Drs2p-Bad and Cdc50p-His₁₀. The co-expression plasmid, derived from pYeDP60, contained sequences coding for *CDC50* fused to a C-terminal His₁₀ tag (gray arrow) and for *DRS2* fused to a C-terminal Bad tag (black arrow) both under the control of an inducible *GAL10/CYC1* hybrid promoter. A short sequence coding for a TEV or a thrombin cleavage site was also inserted between *DRS2* and *CDC50* open reading frames and their respective tags. *ADE2*, auxotrophy selection marker for adenine; *Ori*, bacterial replication origin; *Amp^R*, gene conferring resistance to ampicillin; *2μ*, yeast replication origin; *URA3*, auxotrophy selection marker for uracil; *SbfI*, restriction sites.

Detection of Cdc50p-His₁₀ (Fig. 2A) revealed several bands: the slowest band ran just above the 50-kDa marker, and the fastest band ran between 37 and 50 kDa. In view of the fact that the expected molecular mass for Cdc50p-His₁₀ is about 43 kDa and that Cdc50p contains four consensus sequences for *N*-linked glycosylation (Asn-Xaa-(Ser/Thr)) in its large luminal loop, a likely hypothesis is that the slowest band corresponds to glycosylated Cdc50p-His₁₀, whereas the fastest band corresponds to a less mature, unglycosylated form (with bands of intermediate mobility corresponding to intermediate levels of glycosylation). This hypothesis was supported by deglycosylation experiments using peptide-*N*-glycosidase F (see Fig. 3B below).

The pattern of Cdc50p-His₁₀ glycosylation exhibited significant differences in P2 *versus* P3 membranes: in P3 membranes, but not in P2 membranes, the mature form of Cdc50p-His₁₀ was predominant (see Fig. 2A, two central lanes). This suggests that Cdc50p in the P3 fraction has reached compartments where more complete maturation has occurred. In line with this observation, we found that the TGN marker Tlg2p (29) was more abundant in the P3 fraction than in the P2 fraction (Fig. 2A). Conversely, the endoplasmic reticulum marker Dpm1p was found distributed fairly equally between P3 and P2 membranes (Fig. 2A). Note that the glycosylation degree of Cdc50p in the D⁺ sample (where the D560N mutant of Drs2p is expressed in combination with Cdc50p) was significantly reduced compared with that in the D⁺ sample even in P3 membranes.

Those members of the P-type ATPase family that have been studied extensively are known to transiently form a phosphorylated intermediate during their catalytic cycle. Therefore, our aim was to reveal the formation of such a phosphorylated intermediate by incubating P3 or P2 membranes with [γ -³²P]ATP followed by acid quenching and filtration. In a previous work,

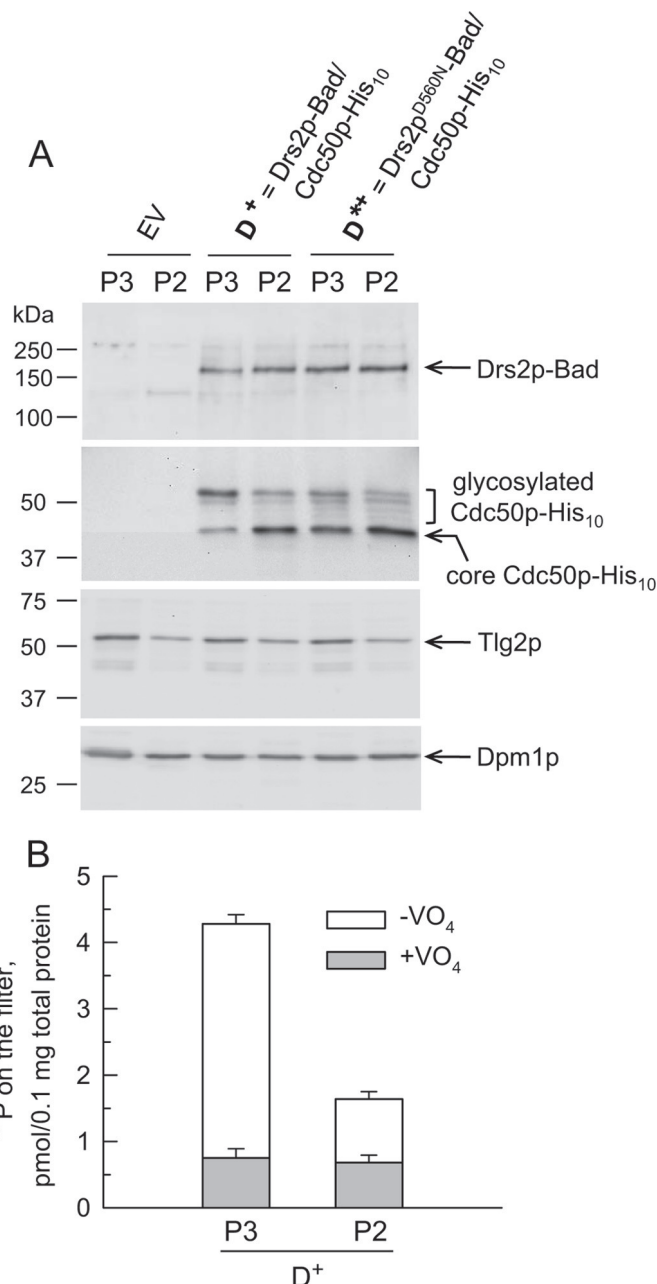


FIGURE 2. Characterization of P2 and P3 membranes from yeast co-expressing Drs2p-Bad and Cdc50p-His₁₀. A, P3 and P2 membranes were obtained from yeast co-expressing Cdc50p-His₁₀ and either wild-type Drs2p (D⁺) or the Drs2p^{D560N} mutant (D⁺), or from yeast transformed with an empty vector (EV). For detection of Drs2p-Bad and Cdc50p-His₁₀ (using a biotin probe and a His probe, respectively), 0.4 μ g of total P3 or P2 proteins was loaded for SDS-PAGE. For detection of Tlg2p (with α -Tlg2p polyclonal antibody), 5 μ g of total P3 or P2 proteins was loaded for SDS-PAGE. For detection of Dpm1p (using an anti-Dpm1p monoclonal antibody), 20 μ g of total P3 or P2 proteins was loaded. B, D⁺ P3 and P2 membrane fractions were tested for the ability of Drs2p to become phosphorylated from ATP (here at 0.5 μ M [γ -³²P]ATP) in the absence or presence of 1 mM orthovanadate (open bars or gray bars, respectively). Data are presented as the mean \pm S.D. (error bars) of duplicates.

vanadate-sensitive phosphorylation of overexpressed Drs2p had been detected only after membrane solubilization and Drs2p purification (23). Here, vanadate-sensitive phosphorylation was already observed in crude yeast membrane fractions. As displayed in Fig. 2B, phosphorylation of Drs2p in P2 mem-

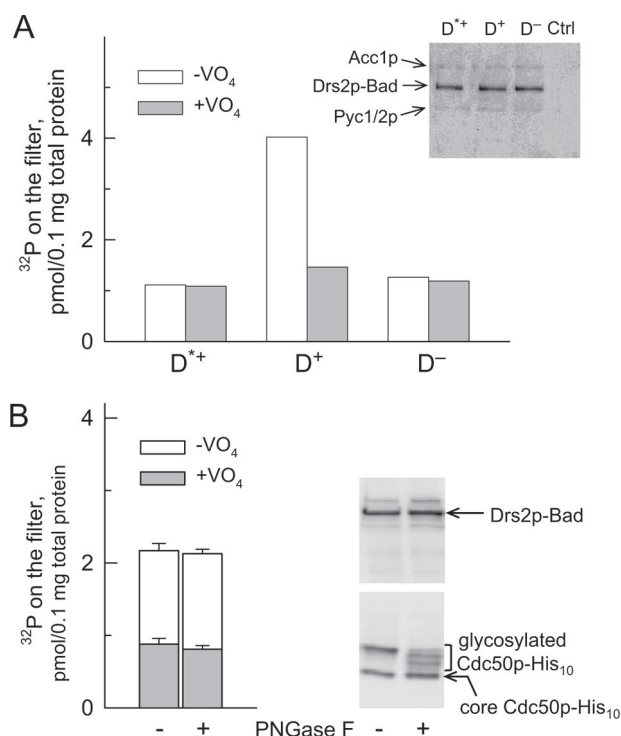


FIGURE 3. Co-expression of Cdc50p, but not its full glycosylation, is required for phosphorylation (from [γ -³²P]ATP) of Drs2p-Bad expressed in P3 membranes. A, P3 membranes containing either Drs2p mutated at the catalytic site and co-expressed with Cdc50p (Drs2p^{D560N}, D⁺), wild-type Drs2p co-expressed with Cdc50p (D⁺), or wild-type Drs2p expressed alone (i.e. in the presence of endogenous Cdc50p only (D⁻)) were used. Samples (200 μ l) were incubated on ice at 0.5 mg of total protein/ml in buffer A supplemented with 100 μ M Ca²⁺ in the absence or presence of 1 mM orthovanadate. At time 0, phosphorylation was triggered by addition of a final concentration of 2 μ M [γ -³²P]ATP; after 25–30 s, this was followed by acid quenching and filtration. This graph shows one representative experiment of several independent experiments with similar results. *Inset*, after loading 0.25 μ g of total protein for SDS-PAGE, Drs2p-Bad was detected using a biotin probe. In the range of molecular masses illustrated, the probe also weakly detected the biotinylated yeast proteins Acc1p (~250 kDa) and Pyc1/2p (~130 kDa). *Ctrl*, yeast membranes that were not transformed with *DRS2*- or *CDC50*-containing plasmid. B, D⁺ P3 membranes suspended at 2 mg/ml in SB containing 1 mg/ml DDM were incubated on ice for 15 min in the absence or presence of 10 μ g/ml peptide-N-glycosidase F (PNGase F) (i.e. 20,000 units/ml). Membranes were subsequently diluted to 0.5 mg/ml in buffer A supplemented with 0.1 mM Ca²⁺ and 1 mM EGTA, and the ability of these samples to become phosphorylated was measured after addition of 0.5 μ M [γ -³²P]ATP in the absence (open bars) or presence (gray bars) of 1 mM orthovanadate. Data are presented as the mean \pm S.D. (error bars) of duplicates. 1.5 μ g of total protein was loaded for Western blot analysis. Detection of Drs2p was performed using a biotin probe, and detection of Cdc50p was performed using a His probe (gels on the right).

branes was 3–4-fold lower than that in P3 membranes (for the same amount of Drs2p or Cdc50p; Fig. 2A). This is consistent with the idea that proper trafficking is a prerequisite for recovery of a functional Drs2p-Cdc50p complex. We thus used P3 membranes for further functional characterization of Drs2p.

Cdc50p-dependent Phosphorylation from [γ -³²P]ATP of Drs2p-Bad at Its Catalytic Aspartate and Effects of Cdc50p Deglycosylation—Because Cdc50 proteins have previously been shown to be required for phosphorylation of purified Drs2p or ATP8B1 (23, 39), we first checked whether this would still be the case in crude membranes obtained with our new overexpression system. As can be seen in Fig. 3A, vanadate-sensitive phosphorylation was indeed strictly dependent on the co-expression of Drs2p and Cdc50p (D⁺ sample as opposed to the

D⁻ sample where Drs2p was expressed in the presence of endogenous Cdc50p alone), whereas for the inactive D⁺ mutant, vanadate-sensitive phosphorylation was insignificant. The virtual insensitivity to VO₄ of D⁺ and D⁻ samples confirms that endogenous Drs2p and Cdc50p are present in negligible amounts compared with the overexpressed proteins.

To check whether the different phosphorylation levels measured in P3 or P2 membranes (see Fig. 2B) imply any direct role of the Cdc50p N-linked sugars on the Drs2p catalytic cycle, we subjected Cdc50p expressed in D⁺ P3 membranes to *in vitro* deglycosylation by peptide-N-glycosidase F. We found (Fig. 3B) that the ability of the initially correctly folded Drs2p to become phosphorylated from [γ -³²P]ATP did not suffer from deglycosylation under incubation conditions (15 min at 4 °C) sufficient to allow the fully glycosylated Cdc50p to disappear.

We then looked for optimal conditions for measuring the steady-state phosphorylation level of D⁺ P3 membranes. The vanadate-dependent phosphoenzyme formed rapidly even at a low concentration of [γ -³²P]ATP: it reached a maximal level after 20–30 s on ice in the presence of 0.5 μ M [γ -³²P]ATP (data not shown and Fig. 8, dotted lines), a low concentration that minimized vanadate-independent phosphorylation. We also found that the measured steady-state phosphorylation level for D⁺ P3 membranes was relatively insensitive to ionic conditions. Changes in pH (between 6 and 8.5; Fig. 4A) and in the KCl or NaCl concentration (between zero and 0.3 M; Fig. 4B) only had minor effects. Adding EGTA to Ca²⁺-containing medium ruled out any significant effect on the steady-state phosphorylation level of the free Ca²⁺ concentration (from 0.01 to 100 μ M) or of the many (and possibly endogenous) metal species that can be chelated by EGTA. The phosphorylation level was also unaltered if the free Mg²⁺ concentration was reduced from 5 to 1 mM, but it decreased for much lower concentrations of free Mg²⁺ consistent with Mg²⁺-ATP being the substrate for phosphorylation as generally accepted for P-type ATPases (40–42). Moderate concentrations of Co²⁺, Zn²⁺, La³⁺, carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone, sulfate, oxalate, or arsenate did not greatly affect the steady-state phosphorylation level (Fig. 4 and data not shown).

Inhibition of Phosphorylation by Orthovanadate and Fluoride Compounds—We next studied in more detail the effect of putative inhibitors (Fig. 5). Micromolar concentrations of orthovanadate were sufficient to strongly inhibit Drs2p phosphorylation. The temperature of incubation did not affect the resulting inhibition (Fig. 5A), and the kinetics of inhibition by 0.1 mM VO₄ were fairly rapid, being completed within 1 min on ice (Fig. 5C). It is well known that in the case of P₂-type ATPases like SERCA1a VO₄ binds rapidly to the Ca²⁺-free (“E2”) form of the pump only, not to its Ca²⁺-bound (“E1”) form (43). The fact that phosphorylation of Drs2p was inhibited by VO₄ after only a short incubation suggests that in P3 membranes Drs2p “at rest” essentially resides in an E2-like conformation.

We also addressed the effect of fluoride compounds known to be reactive with E2-like states of other P-type ATPases (see e.g. Ref. 30). We found that Drs2p phosphorylation was severely inhibited by 1 mM fluoride combined with either 50 μ M BeCl₂ or 50 μ M AlCl₃ (Fig. 5B) and that inhibition was completed within 1 min in the presence of BeCl₂ and within 5 min in the presence

PtdIns(4)P Regulation of Drs2p-Cdc50p Turnover

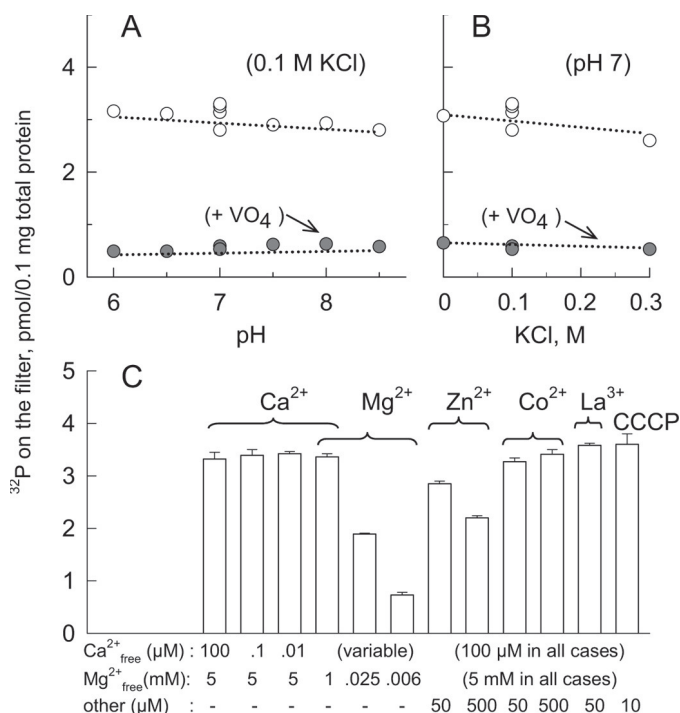


FIGURE 4. Effect of various ionic conditions on phosphorylation (from $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$) of Drs2p-Bad. A and B, the effect of pH and KCl was explored in the absence (open symbols) or presence (gray symbols) of 1 mM orthovanadate. C, the effect of manipulating the concentrations of a few metal ions was tested by adding either 0.6 or 5 mM EGTA (which reduced the free Ca^{2+} concentrations to 0.1 or 0.01 μM as indicated below the corresponding bars); by adding 4, 7.5, or 15 mM EDTA (which also lowered the free Ca^{2+} concentrations to various extents but in addition reduced the free Mg^{2+} concentrations); or by adding 50 or 500 μM Zn^{2+} or Co^{2+} , or 50 μM La^{3+} , or 10 μM H^+ ionophore carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP). Phosphorylation (on ice for 30 s) was triggered by addition of 0.5 μM $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ followed by acid quenching. Data are presented as the mean \pm SD (error bars) of duplicates.

of AlCl_3 (Fig. 5C). 1 mM fluoride alone only exerted very slow inhibition (Fig. 5C). Because of the presence of 5 mM Mg^{2+} in the medium, this slow inhibition could well correspond to inhibitory binding of a magnesium fluoride complex (the same order of reactivity for the various fluoride compounds was also found in the case of SERCA1a; see e.g. Ref. 30). In the absence of KF, BeCl_2 or AlCl_3 only had minor effects on the total phosphorylation level (Fig. 5B).

Inhibition of Drs2p phosphorylation by aluminum fluoride compounds was further characterized. At pH 7 in the presence of 1 mM KF, inhibition was virtually complete already in the presence of 5 μM total AlCl_3 , but the efficiency for inhibition strongly decreased under alkaline conditions (data not shown and Fig. 5D). The latter fact is consistent with the idea that, as for other P-type ATPases, the inhibitory complex could be AlF_4^- whose concentration strongly decreases under alkaline conditions due to increased formation of $\text{Al}(\text{OH})_4^-$ competitors (44). Similarly, at pH 7, inhibition by the aluminum fluoride complex could be minimized or prevented by including an aluminum chelator, either the classical Ca^{2+} chelator EGTA or the iron and aluminum chelator desferrioxamine B (Fig. 5D). If these chelators (or hydroxyl ions) were added after inhibition by aluminum fluoride had developed, Drs2p slowly recovered from its previous inhibition, showing that the inhibitory complex was not formed irreversibly (Fig. 5D).

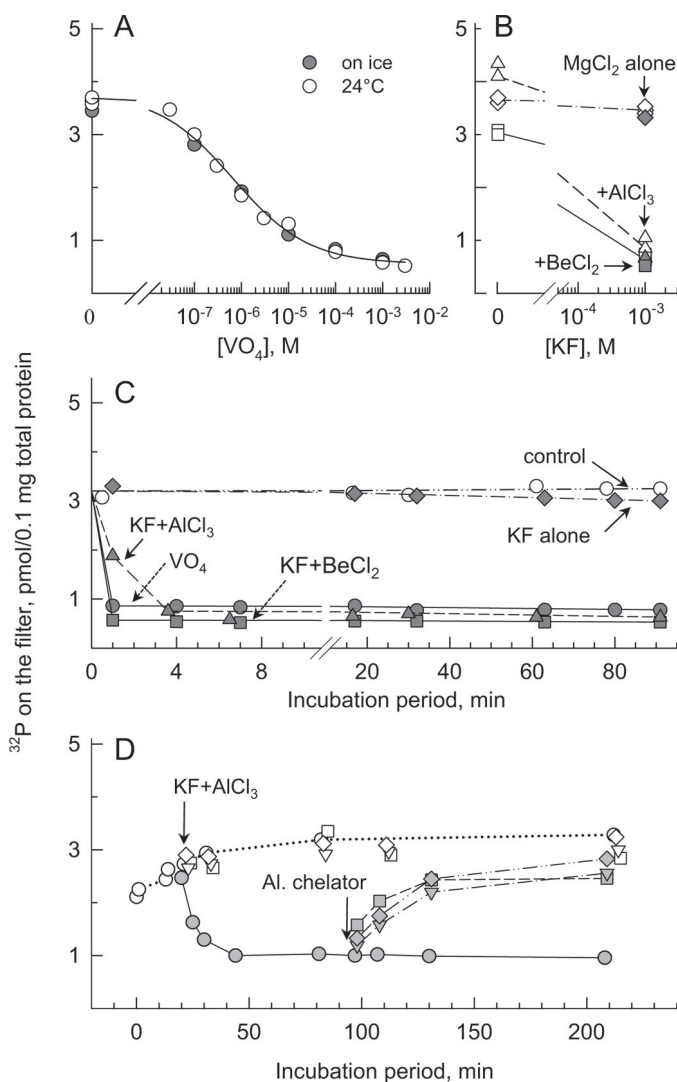


FIGURE 5. Orthovanadate or fluoride compound inhibition of phosphorylation (from $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$) of Drs2p-Bad in P3 membranes. D⁺ P3 membranes were incubated at 0.5 mg of protein/ml in buffer A supplemented with 0.1 mM CaCl_2 , and phosphorylation was subsequently measured 25 s after addition of 0.5 μM $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (on ice). A and B, incubation lasted 1 h and was performed either at 24 °C (open symbols) or on ice (gray symbols) followed in both cases by an additional 20–40 min on ice. A, incubation was performed in the presence of various concentrations of orthovanadate. B, incubation was performed in the absence or presence of KF (1 mM when present) and in the additional presence of either 50 μM BeCl_2 (squares) or 50 μM AlCl_3 (triangles) or in the presence of 5 mM MgCl_2 only (diamonds). C, time dependence of the inhibition by 100 μM VO_4 (gray circles) or by 1 mM KF in the absence (diamonds) or presence of either 50 μM BeCl_2 (squares) or 50 μM AlCl_3 (triangles). Open circles, control incubation in the absence of any added compound. D, D⁺ P3 membranes were diluted on ice to 0.5 mg/ml at time 0 (open circles, dotted line), 50 μM AlCl_3 and 1 mM KF were added at $t = 20$ min, and the residual phosphorylation level was assayed after subsequent chelation. To trigger recovery from inhibition, free aluminum was subsequently chelated at $t = 95$ min by adding either hydroxyl ions (Tris base) to bring the pH up to 8 (squares), 10 mM EGTA (upside down triangles), or 0.2 mM desferrioxamine (diamonds). For a control, Tris, EGTA, and desferrioxamine were also added to the membranes together with AlCl_3 and KF at $t = 20$ min (open squares, triangles, or diamonds).

Solubilization of D⁺ P3 Membranes by Detergents and Short or Long Term Effects of Detergents on Phosphorylation of Solubilized Drs2p-Cdc50p Complex—We then investigated the ability of various detergents to interact with Drs2p-Bad and Cdc50p-His₁₀, solubilize these proteins, and possibly affect their function or stability. Fig. 6A shows that DDM allowed

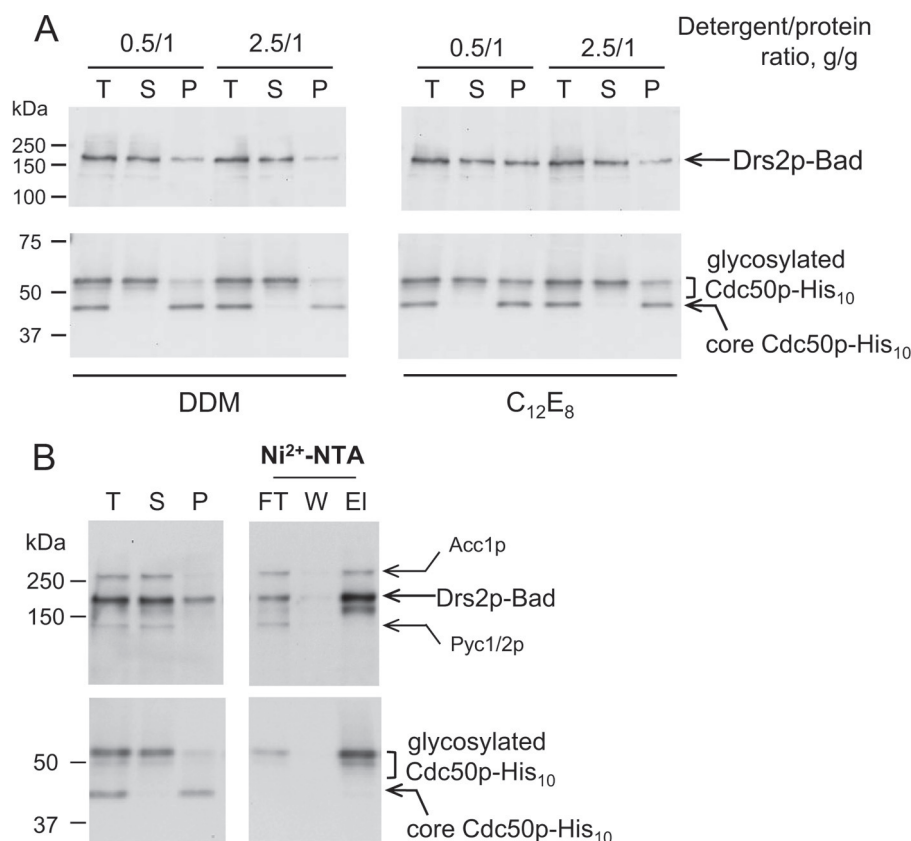


FIGURE 6. Detergent-induced solubilization of glycosylated Drs2p-Cdc50p complex. *A*, D⁺ P3 membranes were diluted to 2 mg of protein/ml in ice-cold SB supplemented with detergent (DDM or C₁₂E₈ with the indicated detergent-to-protein ratio) as well as with PMSF and a mixture of protease inhibitors and incubated as described under "Experimental Procedures" before high speed centrifugation. Pellet (*P*) fraction was resuspended in the same volume as that of the total membrane (*T*) fraction. 0.5 μ g of the total membrane fraction was loaded for SDS-PAGE, and the same volumes of supernatant (*S*) and pellet fractions were loaded as well. Drs2p-Bad was detected using a biotin probe, and Cdc50p-His₁₀ was detected using a His probe. *B*, D⁺ P3 membranes were solubilized with 0.5 g of DDM/g of protein (1 mg/ml DDM) and centrifuged as above. The supernatant was then added to Ni²⁺-NTA beads (400 μ l of slurry for 10 ml of solubilized sample) and incubated overnight. Unbound proteins were collected in the flow-through (*FT*), the resin was washed with 5 ml of "wash" buffer (*W*) (SB supplemented with 0.2 mg/ml DDM), and proteins were eluted with 1.2 ml of "elution" buffer (*EI*) (wash buffer supplemented with 250 mM imidazole). 0.8 μ g of the total membrane fraction and the same volumes of supernatant, pellet, flow-through, wash buffer, and elution buffer fractions were analyzed by Western blotting.

almost complete solubilization of the biotinylated Drs2p-Bad (compare total membrane (*T*), supernatant (*S*), and pellet (*P*) lanes) at DDM-to-protein ratios as low as 0.5 g/g. Solubilization of Drs2p-Bad with C₁₂E₈ proved possible too (Fig. 6*A*). In all cases, the unglycosylated portion of Cdc50p-His₁₀ remained insoluble, whereas solubilization of the glycosylated, mature form displayed a similar dependence on detergent concentration as that of Drs2p-Bad (Fig. 6*A*). Triton X-100 or L- α -lysophosphatidylcholine as well as high critical micelle concentration detergents like CHAPS, Hecameg, or octyl glucoside also efficiently solubilized Drs2p-Bad and glycosylated Cdc50p-His₁₀ (data not shown). When DDM-solubilized D⁺ P3 membranes (at 0.5 g/g DDM-to-protein ratio) were subjected to Ni²⁺-NTA affinity chromatography, a large fraction of both Cdc50p-His₁₀ and Drs2p-Bad did bind to the resin (Fig. 6*B*, compare supernatant (*S*) and flow-through (*FT*) lanes), indicating that both proteins still interact with each other after solubilization with DDM. The two proteins could be co-eluted from the Ni²⁺-NTA beads using imidazole (elution buffer (*EI*) lane).

For testing the effect of various solubilizing detergents on Drs2p function, detergent at a relatively high detergent-to-protein ratio (10 g/g) was added to D⁺ or D⁺ P3 membranes, and [γ -³²P]ATP-dependent phosphorylation was measured. After

short term incubation (1 min), the presence of various detergents in the phosphorylation assay resulted in various levels of phosphorylation for Drs2p (Fig. 7*A*). DDM led to phosphorylation levels slightly higher than in the absence of detergent. Some other detergents, including Triton X-100, digitonin (previously used in Ref. 23), or the short-chain lipid diC₇PC (45), led to lower levels of phosphorylation. In similar experiments, Nonidet P-40, a close relative to Triton X-100, and *n*-dodecyl-*N,N*-dimethylamine-*N*-oxide were found to be rather poor (data not shown).

Because of the known ability of detergents in some cases to induce time-dependent inactivation of membrane proteins (see e.g. Ref. 46), the long term effects of incubation with DDM, C₁₂E₈, and Triton X-100 were also investigated. Of these three non-ionic detergents, DDM appears to be the least inhibitory after incubation for hours on ice (Fig. 7*B*). Compared with DDM, CHAPS either in the absence or in the presence of egg lecithin and DTT (16) did not lead to any gain in stability (data not shown). Similar experiments also demonstrated that α -DDM, C₁₁- β -maltoside, or C₁₀- β -maltoside did not preserve phosphorylation more effectively. Octyl thioglycoside and CYMAL-5 were not stabilizing detergents either (data not shown). Reducing the detergent-to-protein ratio helped to

PtdIns(4)P Regulation of Drs2p-Cdc50p Turnover

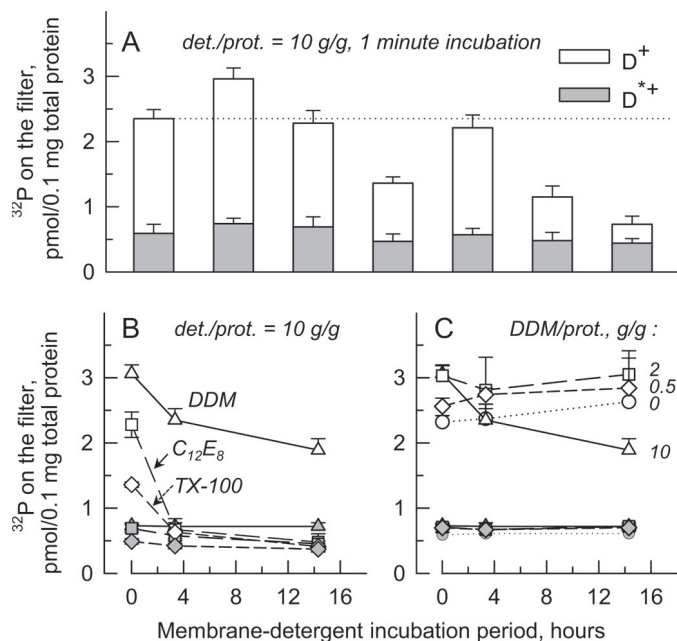


FIGURE 7. Short and long term effects of detergents on phosphorylation (from [γ - 32 P]ATP) of Drs2p-Bad. P3 membranes, either D⁺ (open bars or open symbols) or D^{*+} (gray bars or gray symbols), were suspended at 2 mg/ml in SB supplemented with PMSF and a complete protease inhibitor mixture. *A*, samples were then incubated for 1 min in the presence of various detergents all at 20 mg/ml; the detergents used are indicated (Digit, digitonin; TX-100, Triton X-100). After such incubation, samples were diluted 4-fold into buffer A supplemented with 0.1 mM CaCl₂, and phosphorylation was measured as described earlier using two superimposed A/E filters. Both filters were counted, and the sum of the radioactivities in the two filters was plotted. *B*, for selected detergents, similar measurements were repeated after incubation on ice for a few hours. The detergents tested were DDM (triangles), C₁₂E₈ (squares), and Triton X-100 (diamonds). *C*, DDM was tested at various concentrations, resulting in the various detergent (det.)-to-protein (prot.) ratios indicated. Data are presented as the mean \pm S.D. (error bars, $n = 3$).

maintain Drs2p phosphorylation ability after long term incubation (Fig. 7C): at the low (but still solubilizing) DDM-to-protein ratio of 0.5 g/g, the D⁺ phosphorylation level even slightly increased over time as for membranes (Fig. 7C).

Turnover-dependent Dephosphorylation of Drs2p-Cdc50p Complex as Measured upon Isotopic Dilution of [γ - 32 P]ATP—We revealed turnover-dependent dephosphorylation of Drs2p by chasing the 32 P-labeled phosphorylated species formed in Drs2p-Cdc50p-containing membranes with non-radioactive Mg²⁺-ATP. At 4 °C, a very significant fraction of Drs2p phosphoenzyme resisted ATP chase for minutes (Fig. 8A) in contrast with the much faster and complete phosphoenzyme decay that was observed for SERCA1a under identical conditions (data not shown). This decay was not sensitive to the presence of ADP (instead of Mg²⁺-ATP) in the dephosphorylation medium, but it was clearly sensitive to temperature as expected for an enzymatic process. At high temperature, however, this decay remained fairly slow: the half-time for the slow component of Drs2p dephosphorylation was of the order of 1–2 min at 37 °C (Fig. 8A). The corresponding results for the inactive D^{*+} sample (Fig. 8B) clearly show that most of this slow component of D⁺ dephosphorylation is indeed attributable to Drs2p phosphoenzyme decay, whereas at least part of the observed initial rapid phase of dephosphorylation in Fig. 8A can be accounted for by rapid decay of the background phosphorylation also observed for the inactive mutant.

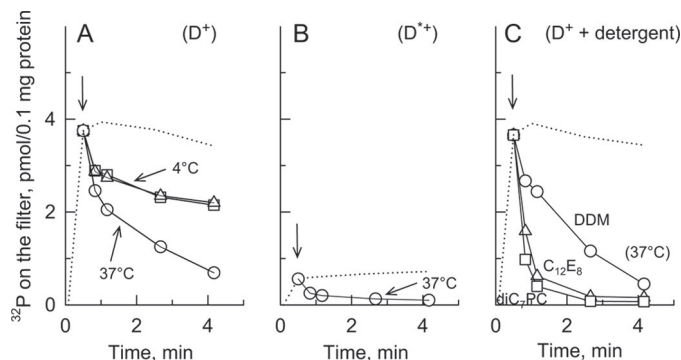


FIGURE 8. Turnover-dependent dephosphorylation of Drs2p-Bad either in membranes or in presence of various detergents. *A*, D⁺ P3 membranes were suspended at 0.5 mg of protein/ml in buffer A supplemented with 100 μ M Ca²⁺ on ice. Phosphorylation was triggered by adding 0.5 μ M [γ - 32 P]ATP and quenched after various periods (dotted line). After 25 s (arrow), aliquots were withdrawn and diluted 5-fold for dephosphorylation under three different conditions: first on ice in the presence of 1 mM non-radioactive Mg²⁺-ATP (squares); in this case, the Mg²⁺-ATP-containing dephosphorylation medium had previously been supplemented with 0.01 mg/ml pyruvate kinase and 0.2 mM phosphoenolpyruvate; second, on ice but in the presence of 1 mM ADP instead of Mg²⁺-ATP and without pyruvate kinase or phosphoenolpyruvate (triangles); and third, in the presence of 1 mM Mg²⁺-ATP but at 37 °C (circles). *B*, dephosphorylation in the presence of Mg²⁺-ATP at 37 °C (as in *A*) using D^{*+} P3 membranes. *C*, before triggering phosphorylation of D⁺ P3 membranes, the membrane suspension had been supplemented with 1 mg of DDM/ml, and dephosphorylation was measured after 5-fold dilution into a Mg²⁺-ATP-containing dephosphorylation medium at 37 °C that also contained a 1 mg/ml concentration of either DDM (circles), C₁₂E₈ (triangles), or diC₇PC (squares). In all cases, the dotted line represents the time course for phosphorylation itself on ice (the actual data points were removed for clarity except for the data point at 25 s). This figure shows one representative experiment of several independent experiments with similar results.

Turnover-dependent decay of the Drs2p-Cdc50p phosphoenzyme was also explored in the presence of detergent. The presence of DDM did not much affect the kinetics of Drs2p-Cdc50p dephosphorylation at 37 °C (Fig. 8, A and C, compare circles), whereas phosphoenzyme decay was made significantly faster in the presence of C₁₂E₈ and even more so in the presence of the short-chain lipid diC₇PC (Fig. 8C).

Effect of Exogenous PS and PtdIns(4)P on Dephosphorylation of Drs2p-Cdc50p Complex—Our ability to measure phosphorylation and dephosphorylation of Drs2p in the presence of detergent prompted us to test the effect of specific lipids in the environment of Drs2p. Unexpectedly, when yeast membranes were solubilized at a relatively high detergent-to-protein ratio (10 g of DDM/g of total protein), allowing a large dilution of proteins and endogenous protein-bound phospholipids within the solubilizing detergent micelles, the presence of exogenous PS during phosphorylation and dephosphorylation (here, 0.05 g of PS/g of DDM; hence, 0.5 g of PS/g of protein) slowed down Drs2p dephosphorylation (Fig. 9A). Control experiments ascertained that most of the non-catalytic phosphorylation dropped during the first rapid phase in all cases (data not shown). The slowing down effect of PS was apparently independent of the nature of the lipid fatty acid chains as it was observed for POPS (Fig. 9A), DMPS, and for a commercial mixture of *E. coli* lipids rich in various types of PS (data not shown). In similar experiments, PS also slowed down the dephosphorylation rate observed in the presence of C₁₂E₈ (data not shown).

Exogenous PS also exerted a slowing down effect on dephosphorylation of the solubilized Drs2p in the presence of exoge-

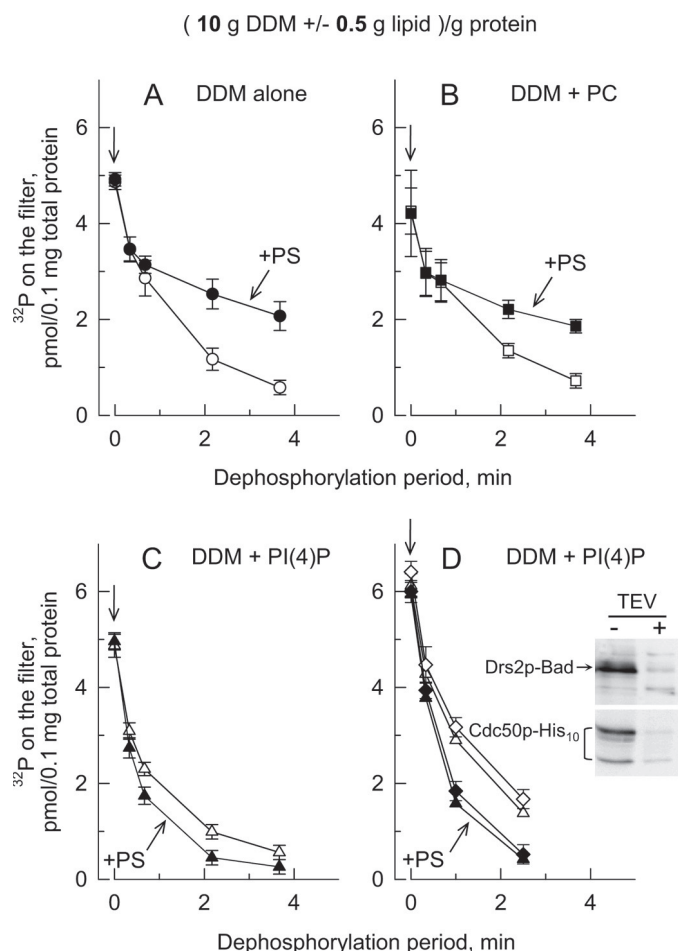


FIGURE 9. Presence of PtdIns(4)P is required to allow PS to stimulate turnover-dependent dephosphorylation of Drs2p in excess DDM. D⁺ P3 samples containing 0.5 mg of protein/ml were first solubilized with 5 mg of DDM/ml supplemented in some cases with various exogenous lipids (0.25 mg of each lipid/ml), resulting in detergent and exogenous lipid-to-total protein ratios of 10 g of DDM/g of protein and 0.5 g of each exogenous lipid/g of protein. After 25 s of phosphorylation from [γ -³²P]ATP in buffer A supplemented with 0.1 mM Ca²⁺ and 1 mM EGTA, samples were either quenched with acid immediately or transferred into a tube pre-equilibrated at 37 °C and containing concentrated non-radioactive Mg²⁺-ATP (so that the final concentration of ATP was 1 mM) for dephosphorylation for various periods before acid quenching. A, open circles, DDM alone; closed circles, DDM + POPs. B, open squares, DDM + POPC; closed squares, DDM + POPC + POPs; C, open triangles, DDM + PtdIns(4)P (PI(4)P); closed triangles, DDM + PtdIns(4)P + POPs. D, dephosphorylation rates in the presence of PtdIns(4)P (open symbols) or PtdIns(4)P + POPs (closed symbols) were measured before (triangles) or after (diamonds) proteolytic excision of the Bad and His₁₀ tags from constructs bearing a TEV cleavage site. Cleavage of the tag was performed by overnight incubation of membranes at 4 °C in the presence of TEV protease. Aliquots were analyzed by Western blotting for the residual tag contents using the biotin probe and the His probe (inset). Data from A and B are presented as the mean \pm S.D. (error bars) of four independent experiments. Data from C are presented as means \pm S.D. (error bars, $n = 5$ of three independent experiments). Data from D are presented as the mean \pm S.D. (error bars) of duplicates.

nously added PC (Fig. 9B). PC alone only slightly slowed down dephosphorylation, and this effect was again apparently independent of the nature of the PC fatty acid chains as POPC and DOPC had similar slightly inhibitory effects (data not shown). The combination of PC and PS was as inhibitory as PS alone (Fig. 9, A and B). Remarkably, if exogenous PtdIns(4)P was added to DDM for the initial Drs2p solubilization, the additional presence of exogenous PS led to a clear acceleration of

Drs2p dephosphorylation as expected for a transported phospholipid, whereas PtdIns(4)P alone already induced slight acceleration (Fig. 9C).

To rule out any possible artifactual role of the C-terminally located Bad tag in Drs2p-Bad, we investigated whether removing this tag would induce any change in the phosphorylation or dephosphorylation properties of Drs2p. Because of proteases cleavage sites inserted in the C terminus, we were able to remove Bad and His₁₀ tags from Drs2p-Bad and Cdc50p-His₁₀ (Fig. 9D, inset), respectively, and protease-treated membranes were solubilized with an excess of DDM. After tag removal, the effects of PS and PtdIns(4)P on phosphoenzyme decays were unchanged (Fig. 9D). This shows that the C-terminally located Bad sequence on Drs2p (as well as the His₁₀ tag on Cdc50p) does not interfere with catalytic turnover and regulation of Drs2p function by PtdIns(4)P. Experiments similar to those illustrated in Fig. 9 but performed in the presence of lower relative amount of lipids showed weaker effects of POPC, POPs, and PtdIns(4)P (data not shown), suggesting that these lipids bind to their sites on Drs2p with relatively poor apparent affinity when they have to compete with an excess of DDM.

DISCUSSION

Co-expression of Drs2p and Cdc50p—Although several lines of evidence indicate that Drs2p is responsible for phospholipid flipping across membranes, much remains to be discovered about the translocation mechanism itself and the role of the Drs2p companion protein, Cdc50p. Toward this goal, we constructed a plasmid (Fig. 1) carrying both *DRS2* and *CDC50* genes and allowing for the coordinated overexpression of both proteins at high cell densities. From 1 liter of culture, 300 mg of protein was recovered in the light P3 membrane fraction, 3% of which (*i.e.* about 10 mg) was estimated to be biotinylated Drs2p-Bad accompanied by correctly glycosylated Cdc50p-His₁₀, whereas the heavy P2 fraction was found to contain membranes expressing predominantly a non-glycosylated version of Cdc50p-His₁₀ corresponding to immature Cdc50p that had probably not properly trafficked to Golgi membranes (Fig. 2). The poorer glycosylation observed for Cdc50p co-expressed with the inactive Drs2p^{D560N} mutant (Fig. 2) is consistent with previous data suggesting that mutation of Asp-560 in Drs2p alters the interaction between Drs2p and Cdc50p as measured *in vivo* by the split ubiquitin assay (23).

Functionality of Overexpressed Drs2p-Cdc50p Complex—The quality of the complex formed was suitable for functional analysis without requiring any additional purification step. With Drs2p accounting for about 3% of total proteins in the P3 membrane fraction, the vanadate- or fluoride-sensitive phosphorylation level at steady state of about 3 pmol of ³²P bound/100 μ g of total protein (Figs. 3–9) would correspond to about 1 nmol of ³²P bound/mg of Drs2p protein itself. This suggests that the stoichiometry for Drs2p phosphoenzyme amounts to at least a few tens of %, a value comparable with those reported for purified ATP8A2 in the absence of PS (17). This high phosphorylation level, which is much higher than in previous reports (23, 39), represents a significant improvement for future dissection of the molecular mechanism underlying Drs2p-Cdc50p-mediated lipid transport.

PtdIns(4)P Regulation of Drs2p-Cdc50p Turnover

We found that after Drs2p has acquired an appropriately active conformation due to the chaperone role of fully glycosylated Cdc50p, maintenance of the complete glycosylation of Cdc50p is a prerequisite neither for Drs2p steady-state phosphorylation at its catalytic site (Fig. 3B) nor for its dephosphorylation (data not shown). This agrees with previous reports suggesting that glycosylation of only a few of the potential sites on Cdc50p is sufficient for its function (24).

For subsequent studies after solubilization, DDM was found to be a fair choice as this detergent allowed maintaining the formation of significant amounts of phosphoenzyme while minimizing the rate of detergent-induced irreversible inactivation and preserving the interaction between Drs2p and fully glycosylated Cdc50p (Figs. 6 and 7).

Measurement of Catalytic Turnover of Drs2p-Cdc50p Phosphoenzyme—In previous studies with either Drs2p-Cdc50p complex purified from yeast membranes or human ATP8B1-CDC50A complex purified from baculovirus-infected cells, only a very minor fraction of the phosphoenzyme formed was found capable of undergoing turnover-dependent dephosphorylation even in the presence of PS in the dephosphorylation medium (23, 39). Time-dependent decay of a ^{32}P -labeled phosphorylated state of the purified ATP8A1 (ATPase II) has been reported previously (47), but in that study, the time dependence measured probably does not reflect the true kinetics of the catalytic cycle but merely the time needed for exhaustion of $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ from the medium. In addition, the observed phosphoenzyme was formed in the absence of Mg^{2+} , and it was detected after alkaline SDS-PAGE, an odd situation for the anticipated acylphosphate phosphoenzyme (48). Only very recently has it been possible to clearly observe the turnover-dependent phosphoenzyme decay of a P_4 -ATPase, namely human ATP8A2 (17).

Here, we were able for the first time to measure turnover-dependent decay of the ^{32}P -labeled Drs2p-Cdc50p phosphoenzyme (Fig. 8). The kinetics of this decay were found to be ADP-insensitive (Fig. 8A), which according to classical rationales for P-type ATPases would characterize Drs2p phosphoenzyme formed at 4 °C as “mainly E2P.” In contrast, the ATP8A2 phosphoenzyme contains a significant proportion of the ADP-sensitive E1P form (17).

Effects of PS and PtdIns(4)P on Turnover-dependent Phosphoenzyme Decay—In the case of P_2 -ATPases like SERCA1a Ca^{2+} -ATPase or Na^+, K^+ -ATPase, it is the binding of counter-transported H^+ and K^+ ions to the transport site in the E2P state that stimulates E2P dephosphorylation via the TGE motif of their A-domain (9, 49). Assuming that P_4 - and P_2 -ATPases share the same basic mechanism for transport, binding of the transported substrate (PS in the case of Drs2p) should therefore stimulate dephosphorylation of Drs2p, and this is indeed what is observed with ATP8A2 (17). However, when solubilization of yeast membranes was performed with a high DDM-to-protein ratio, the mere addition of PS to DDM slowed down Drs2p dephosphorylation. PS exerted its expected stimulatory effect on Drs2p dephosphorylation only in the presence of PtdIns(4)P (Fig. 9). Because the solubilized Drs2p was *preincubated* with PS in these experiments, there is no doubt that PS had ample time to reach its binding sites on Drs2p.

Note that when membrane solubilization was performed with a 10-fold lower detergent-to-protein ratio addition of PS no longer exerted any effect, and PtdIns(4)P was now stimulatory both in the absence and the presence of PS (data not shown). A likely reason for these results is that at such a modest DDM-to-protein ratio the PS-binding sites on Drs2p-Cdc50p remained occupied by endogenous PS derived from the yeast Golgi membranes so that addition of exogenous PS did not have any additional effect. But the PtdIns(4)P-binding sites on Drs2p-Cdc50p remained essentially unoccupied presumably because of the known instability of PtdIns(4)P and therefore the absence of any endogenous PtdIns(4)P in the final membrane fraction (hence the stimulating effect of added PtdIns(4)P).

If this interpretation is correct, the data at a high DDM-to-protein ratio are those that best reveal the intrinsic modulatory properties of the membrane lipids, namely the strict requirement for PtdIns(4)P for allowing PS to stimulate the catalytic cycle of Drs2p. Thus, our observations provide the enzymological basis for the recently established fact that PtdIns(4)P stimulates NBD-PS translocation in the TGN (25). This stimulation appears to be due to acceleration of the dephosphorylation step, a step at which the phospholipid ligand is expected to be loaded on the flippase.

From a physiological point of view, PtdIns(4)P is a crucial component of the signaling cascade for clathrin-coated vesicle formation at the TGN (26, 27). The dependence of Drs2p-Cdc50p phosphoenzyme decay on PtdIns(4)P is consistent with the need of enhanced phospholipid transport by Drs2p when vesicle budding is required (25).

It might appear as a paradox that the ligand to be transported by Drs2p (PS) does not stimulate pump dephosphorylation (and therefore completion of its catalytic cycle) in all cases and may even slow down this step. But this is only because in most classical cases coupling of P-type pump dephosphorylation to ion transport is quite tight (see *e.g.* Ref. 50). From a general enzymological point of view, this tight coupling is not strictly necessary. In the absence of PtdIns(4)P, the Drs2p enzyme might display an uncoupled catalytic cycle. The mitochondrial P_450 enzyme is a classical example of an enzyme for which the balance between the desired oxidation of substrates and parallel abortive mechanisms is highly variable from one substrate to the other (51, 52). Even for P_2 -type ATPases (for instance Ca^{2+} -ATPase), the existence of uncoupled pathways for dephosphorylation has been suggested, either for different isoforms or under different situations (53–56).

Phosphoenzyme Turnover Is Slower for Drs2p-Cdc50p Complex than for Mammalian Photoreceptor P_4 -ATPase, ATP8A2—For our complex, we found rather slow dephosphorylation rate constants (in the min^{-1} range) both in membranes and in DDM (see Figs. 8 and 9).

These slow dephosphorylation rate constants are not incompatible with the faster rate constants deduced from overall ATP hydrolysis rates measured previously for purified Drs2p (15). Indeed, those hydrolysis measurements were performed in the presence of C_{12}E_9 , a detergent mixture related to the pure C_{12}E_8 detergent that in the present study strongly accelerated phosphoenzyme decay (Fig. 8C). Moreover, the rates of Drs2p-dependent NBD-PS translocation measured in proteoliposomes

were much slower (15) than what would have been expected (assuming a coupling ratio close to 1) from the ATP hydrolysis rates measured in the presence of $C_{12}E_9$.

Nevertheless, the turnover rate constants measured for our complex are definitely slower than those deduced from the overall hydrolytic activity as well as from direct dephosphorylation measurements of human P_4 -ATPase ATP8A2 from photoreceptor outer segment disc membranes (16, 17). In addition, ATP8A2 ATPase activity has been described to be greatly stimulated by PS without any special requirement for PtdIns(4)P (16, 17). One possible interpretation for these apparent discrepancies between our results with Drs2p and those for ATP8A2 is that Drs2p-catalyzed lipid flip-flop in yeast TGN membranes does not need to be especially rapid. In contrast, ATP8A2 localized in retina might have to counterbalance rapid dissipation of lipid asymmetry by the "floppase" activity of opsin (57). From a mechanistic point of view, the fast turnover rate of ATP8A2 and its apparent lack of sensitivity to PtdIns(4)P might come from the fact that there is only poor conservation of the C-terminal tail (including the putative RMKKQR PtdIns(4)P-binding site (25)) between these two P_4 -ATPases.

Directly performing ATPase activity measurements on yeast P3 membranes with overexpressed Drs2p would of course be desirable. We made a few attempts along this line, but they remained unsuccessful because of the high background ATPase activity found in our crude yeast membrane fractions. Compared with this relatively high background activity, the expected activity resulting from dephosphorylation of 30–40 pmol/mg total protein with a dephosphorylation rate constant of $0.5\text{--}1\text{ min}^{-1}$ would indeed be 2 or 3 orders of magnitude lower. Reliable measurements must therefore await complete purification of the Drs2p-Cdc50p complex.

N- or C-terminal Location of Drs2p Tag?—A C-terminally TAP-tagged Drs2p was recently found to be functional in complementation experiments *in vivo* but not functional *in vitro* after affinity purification (15). In contrast, in the present work, C-terminally tagged Drs2p co-expressed with Cdc50p remained phosphorylatable from [γ - 32 P]ATP over long periods of time in the presence of moderate but solubilizing DDM concentrations, suggesting that Drs2p experiences only a small amount of time-dependent irreversible inactivation under these conditions. As time-dependent inactivation in our experiments was much more of concern in the presence of $C_{12}E_8$ (Fig. 7B), it is conceivable that $C_{12}E_9$, which was used in Ref. 15, led to lability of the C-terminally tagged Drs2p-TAP construct during its purification, whereas this lability was somehow not shared by N-terminally tagged TAP-Drs2p.

Beyond these speculations, we measured phosphorylation and dephosphorylation of the Drs2p-Cdc50p complex expressed in P3 membranes after removal of the Bad and His₁₀ tags by proteolytic treatment. The fact that we did not detect any significant difference between treated and untreated membranes (Fig. 9D) indicates that the C-terminally located Bad tag does not perturb the catalytic cycle of Drs2p.

Fluoride Compounds and Perspectives for Purification of Drs2p-Cdc50p Complex—For future purification and structural characterization of the Drs2p-Cdc50p complex, the instability of Drs2p at a high detergent-to-protein ratio should probably

be kept in mind. In the context of such time-dependent detergent-induced denaturation, our finding that fluoride compounds react with Drs2p (Fig. 5) might offer an interesting perspective similar to the one that turned out to be very useful for SERCA1a crystallization. Indeed, preliminary reaction of SERCA1a with these fluoride compounds was found to afford a strong protection of SERCA1a against irreversible denaturation during the subsequent lengthy process of purification and crystallization in the presence of detergent (58). Crystallization of aluminum or beryllium fluoride forms of Drs2p might therefore be the aim of studies in the near future.

Acknowledgments—We thank T. Graham for fruitful discussion and R. Kaback for critically reading the manuscript.

REFERENCES

- van Meer, G., Voelker, D. R., and Feigenson, G. W. (2008) Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 112–124
- Alder-Baerens, N., Lisman, Q., Luong, L., Pomorski, T., and Holthuis, J. C. (2006) Loss of P_4 ATPases Drs2p and Dnf3p disrupts aminophospholipid transport and asymmetry in yeast post-Golgi secretory vesicles. *Mol. Biol. Cell* **17**, 1632–1642
- Mercer, J., and Helenius, A. (2008) Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells. *Science* **320**, 531–535
- Fadok, V. A., Bratton, D. L., Rose, D. M., Pearson, A., Ezekewitz, R. A., and Henson, P. M. (2000) A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* **405**, 85–90
- Rosing, J., Tans, G., Govers-Riemsag, J. W., Zwaal, R. F., and Hemker, H. C. (1980) The role of phospholipids and factor Va in the prothrombinase complex. *J. Biol. Chem.* **255**, 274–283
- Muthusamy, B. P., Natarajan, P., Zhou, X., and Graham, T. R. (2009) Linking phospholipid flippases to vesicle-mediated protein transport. *Biochim. Biophys. Acta* **1791**, 612–619
- Devaux, P. F. (1991) Static and dynamic lipid asymmetry in cell membranes. *Biochemistry* **30**, 1163–1173
- Daleke, D. L. (2007) Phospholipid flippases. *J. Biol. Chem.* **282**, 821–825
- Palmgren, M. G., and Nissen, P. (2011) P-type ATPases. *Annu. Rev. Biochem.* **40**, 243–266
- Gall, W. E., Geething, N. C., Hua, Z., Ingram, M. F., Liu, K., Chen, S. I., and Graham, T. R. (2002) Drs2p-dependent formation of exocytic clathrin-coated vesicles *in vivo*. *Curr. Biol.* **12**, 1623–1627
- Hua, Z., Fatheddin, P., and Graham, T. R. (2002) An essential subfamily of Drs2p-related P-type ATPases is required for protein trafficking between Golgi complex and endosomal/vacuolar system. *Mol. Biol. Cell* **13**, 3162–3177
- Pomorski, T., Lombardi, R., Riezman, H., Devaux, P. F., van Meer, G., and Holthuis, J. C. (2003) Drs2p-related P-type ATPases Dnf1p and Dnf2p are required for phospholipid translocation across the yeast plasma membrane and serve a role in endocytosis. *Mol. Biol. Cell* **14**, 1240–1254
- Tang, X., Halleck, M. S., Schlegel, R. A., and Williamson, P. (1996) A subfamily of P-type ATPases with aminophospholipid transporting activity. *Science* **272**, 1495–1497
- Chen, S., Wang, J., Muthusamy, B. P., Liu, K., Zare, S., Andersen, R. J., and Graham, T. R. (2006) Roles for the Drs2p-Cdc50p complex in protein transport and phosphatidylserine asymmetry of the yeast plasma membrane. *Traffic* **7**, 1503–1517
- Zhou, X., and Graham, T. R. (2009) Reconstitution of phospholipid translocase activity with purified Drs2p, a type-IV P-type ATPase from budding yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 16586–16591
- Coleman, J. A., Kwok, M. C., and Molday, R. S. (2009) Localization, purification, and functional reconstitution of the P_4 -ATPase Atp8a2, a phosphatidylserine flippase in photoreceptor disc membranes. *J. Biol. Chem.* **284**, 32670–32679

17. Coleman, J. A., Vestergaard, A. L., Molday, R. S., Vilsen, B., and Peter Andersen, J. (2012) Critical role of a transmembrane lysine in aminophospholipid transport by mammalian photoreceptor P4-ATPase ATP8A2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 1449–1454
18. Saito, K., Fujimura-Kamada, K., Furuta, N., Kato, U., Umeda, M., and Tanaka, K. (2004) Cdc50p, a protein required for polarized growth, associates with the Drs2p P-type ATPase implicated in phospholipid translocation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **15**, 3418–3432
19. Furuta, N., Fujimura-Kamada, K., Saito, K., Yamamoto, T., and Tanaka, K. (2007) Endocytic recycling in yeast is regulated by putative phospholipid translocases and the Ypt31p/32p-Rcy1p pathway. *Mol. Biol. Cell* **18**, 295–312
20. Paulusma, C. C., Folmer, D. E., Ho-Mok, K. S., de Waart, D. R., Hilarius, P. M., Verhoeven, A. J., and Oude Elferink, R. P. (2008) ATP8B1 requires an accessory protein for endoplasmic reticulum exit and plasma membrane lipid flippase activity. *Hepatology* **47**, 268–278
21. van der Velden, L. M., Wichers, C. G., van Breevoort, A. E., Coleman, J. A., Molday, R. S., Berger, R., Klomp, L. W., and van de Graaf, S. F. (2010) Heteromeric interactions required for abundance and subcellular localization of human CDC50 proteins and class 1 P4-ATPases. *J. Biol. Chem.* **285**, 40088–40096
22. Poulsen, L. R., López-Marqués, R. L., McDowell, S. C., Okkeri, J., Licht, D., Schulz, A., Pomorski, T., Harper, J. F., and Palmgren, M. G. (2008) The *Arabidopsis* P4-ATPase ALA3 localizes to the Golgi and requires a β -subunit to function in lipid translocation and secretory vesicle formation. *Plant Cell* **20**, 658–676
23. Lenoir, G., Williamson, P., Puts, C. F., and Holthuis, J. C. (2009) Cdc50p plays a vital role in the ATPase reaction cycle of the putative aminophospholipid transporter Drs2p. *J. Biol. Chem.* **284**, 17956–17967
24. Coleman, J. A., and Molday, R. S. (2011) Critical role of the β -subunit CDC50A in the stable expression, assembly, subcellular localization, and lipid transport activity of the P4-ATPase ATP8A2. *J. Biol. Chem.* **286**, 17205–17216
25. Natarajan, P., Liu, K., Patil, D. V., Sciorra, V. A., Jackson, C. L., and Graham, T. R. (2009) Regulation of a Golgi flippase by phosphoinositides and an ArfGEF. *Nat. Cell Biol.* **11**, 1421–1426
26. Graham, T. R., and Burd, C. G. (2011) Coordination of Golgi functions by phosphatidylinositol 4-kinases. *Trends Cell Biol.* **21**, 113–121
27. Vicinanza, M., D'Angelo, G., Di Campli, A., and De Matteis, M. A. (2008) Phosphoinositides as regulators of membrane trafficking in health and disease. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 2833–2841
28. Puts, C. F., Lenoir, G., Krijgsveld, J., Williamson, P., and Holthuis, J. C. (2010) A P4-ATPase protein interaction network reveals a link between aminophospholipid transport and phosphoinositide metabolism. *J. Proteome Res.* **9**, 833–842
29. Holthuis, J. C., Nichols, B. J., Dhruvakumar, S., and Pelham, H. R. (1998) Two syntaxin homologues in the TGN/endosomal system of yeast. *EMBO J.* **17**, 113–126
30. Picard, M., Toyoshima, C., and Champeil, P. (2006) Effects of inhibitors on luminal opening of Ca^{2+} binding sites in an E2P-like complex of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase with Be^{2+} -fluoride. *J. Biol. Chem.* **281**, 3360–3369
31. Jidenko, M., Lenoir, G., Fuentes, J. M., le Maire, M., and Jaxel, C. (2006) Expression in yeast and purification of a membrane protein, SERCA1a, using a biotinylated acceptor domain. *Protein Expr. Purif.* **48**, 32–42
32. Lenoir, G., Menguy, T., Corre, F., Montigny, C., Pedersen, P. A., Thinès, D., le Maire, M., and Falson, P. (2002) Overproduction in yeast and rapid and efficient purification of the rabbit SERCA1a Ca^{2+} -ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* **1560**, 67–83
33. Pompon, D., Louerat, B., Bronine, A., and Urban, P. (1996) Yeast expression of animal and plant P450s in optimized redox environments. *Methods Enzymol.* **272**, 51–64
34. Cardi, D., Montigny, C., Arnou, B., Jidenko, M., Marchal, E., le Maire, M., and Jaxel, C. (2010) Heterologous expression and affinity purification of eukaryotic membrane proteins in view of functional and structural studies: the example of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *Methods Mol. Biol.* **601**, 247–267
35. Smith, P. K., Krohn, R. L., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., and Klenk, D. C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76–85
36. Hatori, Y., Hirata, A., Toyoshima, C., Lewis, D., Pilankatta, R., and Inesi, G. (2008) Intermediate phosphorylation reactions in the mechanism of ATP utilization by the copper ATPase (CopA) of *Thermotoga maritima*. *J. Biol. Chem.* **283**, 22541–22549
37. Parks, T. D., Leuther, K. K., Howard, E. D., Johnston, S. A., and Dougherty, W. G. (1994) Release of proteins and peptides from fusion proteins using a recombinant plant virus proteinase. *Anal. Biochem.* **216**, 413–417
38. Chen, C. Y., Ingram, M. F., Rosal, P. H., and Graham, T. R. (1999) Role for Drs2p, a P-type ATPase and potential aminophospholipid translocase, in yeast late Golgi function. *J. Cell Biol.* **147**, 1223–1236
39. Bryde, S., Hennrich, H., Verhulst, P. M., Devaux, P. F., Lenoir, G., and Holthuis, J. C. (2010) CDC50 proteins are critical components of the human class-1 P4-ATPase transport machinery. *J. Biol. Chem.* **285**, 40562–40572
40. Makinose, M. (1969) The phosphorylation of the membranal protein of the sarcoplasmic vesicles during active calcium transport. *Eur. J. Biochem.* **10**, 74–82
41. Fukushima, Y., and Post, R. L. (1978) Binding of divalent cation to phosphoenzyme of sodium- and potassium-transport adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* **253**, 6853–6862
42. Shigekawa, M., Wakabayashi, S., and Nakamura, H. (1983) Reaction mechanism of Ca^{2+} -dependent adenosine triphosphatase of sarcoplasmic reticulum. ATP hydrolysis with CaATP as a substrate and role of divalent cation. *J. Biol. Chem.* **258**, 8698–8707
43. Pick, U. (1982) The interaction of vanadate ions with the Ca-ATPase from sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **257**, 6111–6119
44. Macdonald, T. L., and Martin, R. B. (1988) Aluminum ion in biological systems. *Trends Biochem. Sci.* **13**, 15–19
45. Hauser, H. (2000) Short-chain phospholipids as detergents. *Biochim. Biophys. Acta* **1508**, 164–181
46. Lund, S., Orłowski, S., de Foresta, B., Champeil, P., le Maire, M., and Møller, J. V. (1989) Detergent structure and associated lipid as determinants in the stabilization of solubilized Ca^{2+} -ATPase from sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **264**, 4907–4915
47. Ding, J., Wu, Z., Crider, B. P., Ma, Y., Li, X., Slaughter, C., Gong, L., and Xie, X. S. (2000) Identification and functional expression of four isoforms of ATPase II, the putative aminophospholipid translocase. Effect of isoform variation on the ATPase activity and phospholipid specificity. *J. Biol. Chem.* **275**, 23378–23386
48. Hokin, L. E., Sastry, P. S., Galsworthy, P. R., and Yoda, A. (1965) Evidence that a phosphorylated intermediate in a brain transport adenosine triphosphatase is an acyl phosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **54**, 177–184
49. Clausen, J. D., Vilsen, B., McIntosh, D. B., Einholm, A. P., and Andersen, J. P. (2004) Glutamate-183 in the conserved TGES motif of domain A of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase assists in catalysis of E2/E2P partial reactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 2776–2781
50. Møller, J. V., Olesen, C., Winther, A. M., and Nissen, P. (2010) The sarcoplasmic Ca^{2+} -ATPase: design of a perfect chemi-osmotic pump. *Q. Rev. Biophys.* **43**, 501–566
51. Pompon, D. (1987) Rabbit liver cytochrome P-450 LM2: roles of substrates, inhibitors, and cytochrome b5 in modulating the partition between productive and abortive mechanisms. *Biochemistry* **26**, 6429–6435
52. Perret, A., and Pompon, D. (1998) Electron shuttle between membrane-bound cytochrome P450 3A4 and b5 rules uncoupling mechanisms. *Biochemistry* **37**, 11412–11424
53. Yu, X., and Inesi, G. (1995) Variable stoichiometric efficiency of Ca^{2+} and Sr^{2+} transport by the sarcoplasmic reticulum ATPase. *J. Biol. Chem.* **270**, 4361–4367
54. de Meis, L. (2002) Ca^{2+} -ATPases (SERCA): energy transduction and heat production in transport ATPases. *J. Membr. Biol.* **188**, 1–9

55. Mall, S., Broadbridge, R., Harrison, S. L., Gore, M. G., Lee, A. G., and East, J. M. (2006) The presence of sarcolipin results in increased heat production by Ca^{2+} -ATPase. *J. Biol. Chem.* **281**, 36597–36602
56. de Meis, L. (2003) Brown adipose tissue Ca^{2+} -ATPase: uncoupled ATP hydrolysis and thermogenic activity. *J. Biol. Chem.* **278**, 41856–41861
57. Menon, I., Huber, T., Sanyal, S., Banerjee, S., Barré, P., Canis, S., Warren, J. D., Hwa, J., Sakmar, T. P., and Menon, A. K. (2011) Opsin is a phospholipid flippase. *Curr. Biol.* **21**, 149–153
58. Yamasaki, K., Daiho, T., and Suzuki, H. (2002) Remarkable stability of solubilized and delipidated sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase with tightly bound fluoride and magnesium against detergent-induced denaturation. *J. Biol. Chem.* **277**, 13615–13619

Résumé

Co-expression et caractérisation fonctionnelle d'un transporteur de lipides (une « flippase ») de la levure *S. cerevisiae* : l'ATPase P4 Drs2p, en complexe avec sa sous-unité associée Cdc50p.

Les membranes plasmiques et les membranes du *trans*-Golgi des cellules eucaryotes présentent une asymétrie des lipides qui les composent, avec les aminophospholipides (APLs : phosphatidylsérine et phosphatidyléthanolamine) enrichis dans le feuillet cytosolique. La dissipation de cette asymétrie est impliquée dans de nombreux processus (patho)physiologiques. Plusieurs études suggèrent que les ATPases P4 sont les candidats les plus probables pour le transport des APLs et le maintien de leur distribution asymétrique ; leur délétion dans la levure inhibe le trafic membranaire. En outre, des études ont montré que les ATPases P4 interagissaient avec les protéines de la famille CDC50 ; cette interaction est essentielle pour l'adressage et peut-être aussi la fonction des ATPases P4. Afin de contribuer à la compréhension du mécanisme de transport des lipides par les ATPases P4, l'objectif de ce travail a été de mettre au point la co-expression fonctionnelle, dans la levure, de l'ATPase P4 Drs2p et de sa protéine partenaire Cdc50p. Nous avons obtenu une fraction membranaire enrichie à 3% avec la protéine Drs2p, majoritairement en complexe avec Cdc50p. L'étude fonctionnelle du complexe nous a permis de mettre en évidence un rôle crucial du phosphatidylinositol-4-phosphate (PI(4)P), un important régulateur du trafic membranaire, au cours d'une étape particulière du cycle catalytique. Nous avons également développé un protocole de purification sur résine streptavidine du complexe Drs2p/Cdc50p. Enfin, comme un site potentiel d'interaction avec le PI(4)P est présent sur l'extrémité C-terminale de Drs2p, nous avons engendré différentes constructions de Drs2p, dans lesquelles une partie de l'extrémité C-terminale a été délétée ; dans une autre construction, l'extrémité N-terminale a également été délétée. Notre travail ouvre la voie à la caractérisation fonctionnelle et structurale détaillée du complexe Drs2p/Cdc50p, et à l'étude du rôle du transport de lipides dans le trafic membranaire.

Mots clés: membranes ; ATPases P4 ; protéines CDC50 ; transport de lipides ; PS ; PI4P ; phosphorylation ; activité ATPasique ; purification.

Summary

Co-expression and functional characterization of a yeast lipid transporter, the P4-ATPase Drs2p in complex with its associated subunit, Cdc50p.

Trans-Golgi membranes and plasma membranes of eukaryotic cells are asymmetric, with their cytosolic leaflet enriched in aminophospholipids (APLs: phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine). Dissipation of this asymmetry is involved in many (patho)physiological processes. P4 ATPases are prime candidates for APL transport and for maintaining asymmetry across membranes. In addition, yeast deleted for P4 ATPases display membrane trafficking defects. Besides, CDC50 proteins have been shown to interact physically with P4 type ATPases, and this interaction is important for addressing the complex to the right destination, and possibly also for its function. To gain insight into the molecular mechanism of lipid transport by P4 ATPases, the goal of my thesis was to develop the co-expression, in yeast, of a functional P4 ATPase, Drs2p, together with its partner, Cdc50p. The strategy we developed allowed us to obtain a membrane fraction enriched in Drs2p (~3%), mainly in complex with Cdc50p. Functional characterization of the complex identified phosphatidylinositol-4-phosphate (PI4P), a major regulator of membrane trafficking, as a crucial component for rapid completion of the Drs2p/Cdc50p catalytic cycle. We also purified the complex in one step on streptavidin beads. Finally, we started investigating the potential auto-inhibitory roles of the C-terminus (as the C-terminus of Drs2p contains a PI4P binding site) and the N-terminus of Drs2p, by expressing various truncated versions of Drs2p. Our work sets the stage for detailed functional and structural characterization of the Drs2p/Cdc50p complex and its role in membrane traffic.

Keywords: membranes ; P4 ATPases ; CDC50 proteins ; lipid transport ; PS ; PI4P ; phosphorylation ; ATPase activity ; purification.